

Identifizierung und Untersuchung der VTL Eisentransporter in

Arabidopsis thaliana

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Julia Gollhofer

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekanin/Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. Thomas Buckhout
2. Prof. Dr. Bernhard Grimm
3. Prof. Dr. Nicolaus von Wirén

Tag der mündlichen Prüfung: 29.05.2015

Zusammenfassung

Eisenmangel ist ein weltweites Ernährungsproblem für Pflanzen und allen von Ihnen abhängigen Sekundärkonsumenten. Es reduziert den Ertrag, die Qualität und Produktivität von z.B. Kulturpflanzen, was wiederum zu Mangelercheinungen beim Menschen führen kann. Da ca. 50 % der weltweit aufgenommenen Energie aus Getreidesamen stammt, hat die Nahrungsmittelforschung ein großes ökonomisches und wirtschaftliches Interesse daran, die Eisenverfügbarkeit und -Aufnahme der Pflanzen zu erhöhen, bzw. den Transport und die Speicherung innerhalb der Pflanzen, speziell in den Samen, aufzuklären und eine dahin verbessernde Züchtung zu etablieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine kleine Familie von fünf (VTL1-5) neuen potentiellen Eisentransportern in *Arabidopsis thaliana* identifiziert und charakterisiert und somit ein weiterer Baustein zu der Aufklärung der Eisenhomöostase hinzugefügt. Bei den fünf Transportern handelt es sich um CCC1-like Proteine, von denen vier (VTL1-3 und 5) eine eisenabhängig regulierte Expression zeigen. Für VTL1 kann mittels Protein-tag Markierung sehr überzeugend eine Lokalisation in der Vakuolenmembran und ein damit verbundener Eisentransport in die Vakuole, analog zur Funktion von VIT1, gezeigt werden. Da vermutlich ein *knockout* von *VTL1* zur Embryo Lethalität führt und auch die *vit1-1* Mutante einen sehr verkümmerten Phänotyp unter Eisenmangel zeigt, scheinen beide Proteine getrennt voneinander an verschiedenen Schlüsselpositionen im Eisenhaushalt zu wirken. Auch für VTL2 und VTL5 kann eine Lokalisation an der Vakuolenmembran und der damit verbundene Eisenimport postuliert werden. Die heterologe Expression aller drei Gene in $\Delta ccc1$ Zellen führt zur Erhöhung der vakuolären Eisenkonzentration. Für VTL3 und VTL4 wird dagegen eine Lokalisation an der Plasmamembran mit einer Exportfunktion vorgeschlagen, was vorrangig bei der Xylembeladung eine Rolle spielen könnte. Die Tatsache, dass das mCherry-VTL4 Signal in der Plasmamembran von Tabakblattzellen detektiert wurde und *VTL3* und *VTL4* heterolog exprimierende $\Delta ccc1$ Hefe-Zellen einen geringeren Eisengehalt aufweisen als Kontrollzellen, unterstützen diese Annahme. Alle fünf Proteine sind in der Lage sowohl den Mutanten-Phänotyp der $\Delta ccc1$ Hefe-Mutante, wie auch der *Arabidopsis vit1-1* und *nramp3/nramp4* Doppelmutante zu komplementieren. Anhand dieser Tatsachen konnte die Eisentransportfähigkeit bewiesen werden. Von großem Interesse ist hierbei die Tatsache, dass die Überexpression von *VTL1*, 2 und 5 in der *nramp3/nramp4* Mutante zu einer Erhöhung der Eisenkonzentration im Samen führt. Der mögliche Nutzen dieses zusätzlichen Eisendepots und die Übertragbarkeit auf andere Spezies muss hinlänglich geprüft werden, könnte bei Erfolg aber entscheidend zur Verbesserung der Kulturpflanzen-Züchtung beitragen.

Summary

Iron deficiency is a worldwide nutritional problem for plants and in general all heterotrophic organisms. Iron deficiency reduces crop productivity, quality and yield, which in consequence lead to iron deficiency symptoms in humans. Because approximately 50 % of the global human caloric intake is derived from a cereal grain diet, it is not surprising that the emphasis of nutrition research is on uptake, transport and storage of iron in plants, specifically in seeds.

In this doctoral thesis a small family of five potential iron transporters (VTL1-5) in *Arabidopsis thaliana* has been identified and characterized. The results of this research have uncovered further components involved in iron homeostasis. These five transporters are CCC1-like proteins, four of which (VTL1-3, 5) show a pattern of iron-dependent expression. Through the use of a protein tag, VTL1 is shown to be localized on the vacuolar membrane and associated with import of iron into the vacuole. In this respect VTL1 displays an analogous function to VIT1. Since the knockout of *VTL1* likely leads to embryo lethality and seedlings of the *vit1-1* mutant display an ephemeral phenotype caused by iron deficiency, both proteins seem to uniquely influence the iron homeostasis. As for VTL1 both VTL2 and VTL5 are localized on the vacuolar membrane and catalyze iron import. The heterologous expression of all three genes in $\Delta ccc1$ cells leads to an increased vacuolar iron concentration. In contrast, VTL3 and VTL4 may function as iron exporters and play possibly roles in xylem loading. This conclusion is supported by the facts that a mCherry-VTL4 signal is localized to the plasma membrane of tobacco leaf cells and that $\Delta ccc1$ cells in which *VTL3* and *VTL4* are heterologous expressed, show a decreased iron content compared to control cells. All five proteins are able to complement the $\Delta ccc1$ yeast mutant and the two *Arabidopsis vit1-1* and *nramp3/nramp4* mutant phenotypes, thereby demonstrating a function in iron transport. Of potential interesting in this connection is the fact that the overexpression from *VTL1*, 2 and 5 in the *nramp3/nramp4* background leads to an increased iron concentration in seeds. The benefit of this additional iron and the generalization of these results to other species need to be proven; however, these results could form the basis for a crucial improvement in iron nutrition through crop breeding in the future.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1. Eisen	1
1.1.1. Die Funktion von Eisen in Pflanzen	1
1.1.2. Eisenaufnahme in Pflanzen	2
1.1.2.1 Strategie-I-Pflanzen	2
1.1.2.2 Strategie-II-Pflanzen	3
1.1.3. Interzellulärer Eisentransport	5
1.1.4. Intrazellulärer Eisentransport und Speicherung	6
1.1.5. Regulation der Eisenhomöostase und Signalweiterleitung	9
1.2. <i>VTL</i> -Gene, weitere potentielle Eisentransporter	11
1.3. Eisenassimilation in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
1.3.1. Eisenaufnahme in Hefezellen	12
1.3.2. Regulation der Eisenaufnahme in Hefezellen	14
1.3.3. Intrazellulärer Eisentransport und Speicherung in Hefezellen	14
1.4. Eisenassimilation in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	16
1.5 Zielsetzung	18
2. Material und Methoden	19
2.1. Material	19
2.1.1. Geräte	19
2.1.2. Vektoren	20
2.1.3. <i>Primer</i>	20
2.1.4. Lebendmaterial mit entsprechenden Nährmedien	21
2.1.5. Nährmedien	22
2.1.6. Reaktionskits, Enzyme, Antikörper und Fertiglösungen	24
2.1.7. Sonstige Materialien	24
2.2 Methoden	25
2.2.1 Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> und Sterilisation der Samen	25
2.2.2 Stabile Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> (<i>Floral Dip</i>) nach	25
2.2.3 Isolation von DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	25
2.2.4 Isolation von RNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	26

2.2.5	cDNA Synthese und DNase-Reaktion	26
2.2.6	Anzucht von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
2.2.7	Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Zellen, verändert nach	26
2.2.8	Isolation von Sphäroplasten aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Zellen.....	27
2.2.9	Isolation von Vakuolen aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Zellen.....	27
2.2.10	Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	28
2.2.11	Herstellung von chemisch kompetenten <i>Escherichia coli</i> Zellen	28
2.2.12	Transformation von chemisch kompetenten <i>Escherichia coli</i> Zellen	29
2.2.13	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> (Minipräparation).....	29
2.2.14	Anzucht von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	30
2.2.15	Herstellung von chemisch kompetenten <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Zellen	30
2.2.16	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Zellen nach	30
2.2.17	Herstellung von Dauerkulturen	30
2.2.18	DNA-Sequenzierung	31
2.2.19	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
2.2.20	<i>Real-time</i> quantitative PCR (qRT-PCR)	31
2.2.21	DNA und RNA Agarose-Gelelektrophorese nach	31
2.2.22	DNA-Extraktion aus einem Agarosegel.....	32
2.2.23	Spaltung von DNA mittels Restriktionsenzymen (Restriktion).....	32
2.2.24	5'-Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren.....	32
2.2.25	Ligation von DNA-Molekülen	32
2.2.26	Dot-Blot-Analyse	32
2.2.27	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	33
2.2.28	Messung der Eisenkonzentration nach Wolfgang Schmidt.....	33
2.2.29	Färbung von Eisen in Embryonen nach Perls	34
2.2.30	Klonierung der <i>VTL</i> -Promotor-GUS Fusionskonstrukte.....	34
2.2.31	Histochemischer und Fluorometrischer GUS- <i>Assay</i>	34
2.2.32	Klonierung der <i>VTL</i> -mCherry Konstrukte und mikroskopische Auswertung der Lokalisation mittels Konfocalmikroskop.....	35
3.	Ergebnisse	37
3.1	Phylogenetische Einordnung und Untersuchung der eisenabhängigen Expression der <i>VTL</i> Gene.....	37
3.2	Sequenzvergleich und Analyse der putativen Proteinstruktur der <i>VTL</i> -Proteine	40

3.3	Analyse der <i>VTL1</i> und <i>VTL5</i> Promotor Aktivität mittels histochemischem und fluorometrischem GUS-Assay	42
3.3.1	Vergleich der gewebespezifischen Expression von <i>VTL1</i> und <i>VTL5</i> in transgenen <i>Arabidopsis</i> Keimlingen	42
3.3.2	Untersuchung der ernährungsabhängigen Expression von <i>VTL1</i> und <i>VTL5</i> in <i>Arabidopsis</i> Keimlingen	43
3.3.3	<i>Real-time</i> quantitative PCR (qRT-PCR) Analyse der ernährungsabhängigen Expression von <i>VTL1</i> , 2 und 5	46
3.4	Untersuchung der Funktion der VTL-Proteine mittels verschiedener Hefemutanten (Hefekomplementationsversuche)	47
3.4.1	Komplementation der $\Delta ccc1$ Hefemutante	47
3.4.2	Komplementation der $\Delta pmr1$, $\Delta smf1$ und $\Delta zrc1$ Hefemutante.....	48
3.4.3	Bestimmung der Eisenkonzentration in Vakuolen von <i>VTL</i> überexprimierenden $\Delta ccc1$ Hefezellen.....	50
3.5	Lokalisation der <i>VTL</i> Gene in Pflanzenzellen mittels Markergen mCherry	52
3.5.1	Lokalisation von mCherry-VTL1	52
3.5.2	Lokalisation von mCherry-VTL4	54
3.5.3	Bestimmung der Eisenkonzentration von <i>VTL4</i> überexprimierenden Hefezellen.....	56
3.5.4	Bestimmung der Eisenkonzentration von <i>VTL3</i> überexprimierenden Hefezellen.....	57
3.6	Komplementation der <i>vit1-1</i> und <i>nramp3/nramp4 Arabidopsis</i> Mutanten	57
3.6.1	Komplementation der <i>vit1-1 Arabidopsis</i> Mutante.....	58
3.6.2	Komplementation der <i>nramp3/nramp4 Arabidopsis</i> Doppelmutante.....	61
3.7	<i>VTL knockout</i> Mutanten.....	63
3.7.1	Untersuchung der <i>vtl3</i> und <i>vtl5 knockout</i> Mutante	63
3.7.2	Herstellung einer <i>vtl1 knockout</i> Mutante	67
4.	Diskussion.....	68
4.1	Eisenabhängige Expression, phylogenetische Einordnung und Sequenzanalyse der <i>VTL</i> Gene	68
4.2	Eisentransportaktivität der VTL Proteine.....	69
4.2.1	Komplementation der $\Delta ccc1$ Hefemutante	69
4.2.2	Komplementation der <i>vit1-1</i> und <i>nramp3/nramp4</i> Doppelmutante.....	70
4.3	Intrazelluläre Lokalisation der VTL Transporter	71
4.3.1	Lokalisation der Eisentransporter VTL1, 2 und 5 an der Vakuolenmembran.....	71
4.3.2	Mögliche Lokalisation der Eisentransporter VTL3 und VTL4 an der Plasmamembran	72

4.4	Untersuchung der gewebespezifischen Expression der <i>VTL</i> Gene	73
4.4.1	Gewebespezifische Expressionsanalyse mittel Promotor-GUS Fusionskonstrukten	73
4.4.2	Gewebespezifische Expression - <i>Genevestigator</i> Daten.....	73
4.5	Substratspezifität der VTL Transporter	76
4.6	Regulation der VTL Transporter	77
4.6.1	Transkriptionelle Regulation der Expression der <i>VTL</i> Gene	77
4.6.2	Regulation der VTL Transporter untereinander- <i>vtl</i> Mutanten	79
4.6.3	„VTL1 <i>knockout</i> Mutante“	80
4.7	Modell.....	80
4.8	Ausblick.....	82
4.8.1	Relevanz der identifizierten Genfamilie	82
4.8.2	Fortführende Untersuchungen.....	83
5.	Verzeichnisse	84
5.1.	Literaturverzeichnis	84
5.2.	Abbildungsverzeichnis	102
5.3.	Tabellenverzeichnis	104
6.	Anhang.....	105
	Danksagung.....	111
	Publikationen.....	112
	Eidesstattliche Erklärung.....	113

Abkürzungsverzeichnis

A, T, G, C	Adenin, Thymin, Guanin, Cytosin
ABA	Abscisinsäure
AS	Aminosäure(n)
cDNA	komplementäre DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Bis-Aminoethyl-Glykoether-N, N, N', N', -Tetraessigsäure
fw	forward Primer (5' → 3' Leserichtung)
GUS	β-Glucuronidase
kb	Kilobasenpaar
mRNA	messenger RNA
OD	optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PS	Phytosiderophore
rev	reverse Primer (3' → 5' Leserichtung)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan
v/v	Volumen pro Gesamtvolumen
Vol	Volumen /Volumina
VTL	<u>V</u> acuolar <u>I</u> ron <u>T</u> ransporter- <u>L</u> ike
w/v	Gewicht pro Volumeneinheit
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1. Eisen

Obwohl Eisen (Fe) das vierthäufigste Metall in der Erdkruste ist (Lide, 2005), leiden viele Organismen unter Eisenmangel, da das Eisen nur in geringer Konzentration löslich (verfügbar) vorliegt und die Aufnahme aktiv erfolgen muss. Der Mangel beginnt bei den Primärproduzenten, was weltweit die Produktivität der Kulturpflanzen mindert (Vose, 1982) und setzt sich durch die gesamte Nahrungskette bis zum Menschen fort. Laut Weltgesundheitsorganisation (De Benoist, World Health Organization, and Centers for Disease Control and Prevention (U.S.) 2008) ist Eisenmangel die häufigste Mangelkrankung, ca. 2-4 Millionen Menschen leiden darunter.

1.1.1. Die Funktion von Eisen in Pflanzen

Eisen ist ein essentieller Nährstoff für Pflanzen, da es Bestandteil von wichtigen Verbindungen, z.B. den Cytochromen, ist. Cytochrome besitzen eine prosthetische Gruppe und sind Komponenten der Redoxsysteme in den Chloroplasten und Mitochondrien (Marschner, 1995). Außerdem wirkt Eisen in Verbindung mit Schwefel in sogenannten Eisen-Schwefel-Clustern als Ein-Elektronenüberträger z.B. in Ferredoxinen. Ferredoxine wirken wie biologische Kondensatoren, da das Eisen zwischen den Oxidationsstufen +2 und +3 hin- und herwechseln kann. Sie sind Elektronendonatoren für verschiedene Enzyme u.a. der Glutamatsynthase und der Nitrat- und Schwefelreduktase. Außerdem ist Ferredoxin neben dem Cytochrom- b_6f -Komplex, der auch Eisen-Schwefel-Cluster besitzt, ein Elektronenüberträger im zyklischen und nicht-zyklischen Elektronentransport während der Photophosphorylierung (Campbell et al. 2009). Eisenmangel in Pflanzen führt zu einem chlorotischen Phänotyp in jungen, sich entwickelnden Blättern (Marschner, 1995; Gris, 1844), einem gehemmten Wachstum der Primärwurzel und gleichzeitig zu einer verstärkten Verzweigung der Lateralwurzeln und vermehrten Auftreten von Wurzelhaaren, was der Oberflächenvergrößerung dient (Eckhardt, 2000; Schmidt 1999; Moog et al. 1995). Der chlorotische Phänotyp beruht sowohl auf dem Abbau von photosynthetischen Komponenten wie dem Cytochrom b_6f -Komplex und dem Photosystem I (Moseley et al. 2002; Hippler et al. 2001; Wollman et al. 1999), als auch auf der Inaktivität des Enzyms CHL27 (At3g56940), das bei der Synthese des Chlorophylls eine Rolle spielt und Eisen benötigt (Bang et al. 2008; Tottey et al. 2003; Moseley et al. 2002 b). Auch kann eine verminderte Chlorophyllsynthese vorliegen, weil unter Eisenmangel in einem Zwischenschritt der Porphyrinringbildung nicht

ausreichend Fe(II)Acetat eingebaut werden kann (Fe(II)Acetat + 2-Desethyl-phyllporphyrin → 2-Desethyl-phyllporphyrin-methylester Fe-Komplex) (Fischer & Baláz, 1942).

Die schlechte Verfügbarkeit des Bodeneisens und die gleichzeitige Toxizität in sauerstoffhaltiger Umgebung bei Eisenüberschuss, stellt ein stets vorliegendes Problem dar. Eisen wird von den meisten Pflanzen als lösliches Fe^{2+} Ion aufgenommen. Im Boden liegt es jedoch in schwer löslicher Form als Eisen(III)-Oxid oder -Hydroxid vor. Die Konzentration von löslichem Eisen (Fe^{3+}) liegt bei neutralem pH bei 10^{-17} M (Neilands et al. 1987) und somit deutlich unter dem Bedarf von höheren Pflanzen ($10^{-6} - 10^{-5}$; M Guerinot & Yi, 1994). Um trotzdem eine Aufnahme zu ermöglichen, haben höhere Pflanzen zwei Strategien zur Eisenaufnahme entwickelt.

1.1.2. Eisenaufnahme in Pflanzen

Man unterteilt die höheren Pflanzen in sogenannte Strategie-I-Pflanzen, zu denen alle di- und monokotyledonen Pflanzen mit Ausnahme der Gräser zählen und Strategie-II-Pflanzen, welche die Gräser ausmachen (Römheld & Marschner, 1986).

1.1.2.1 Strategie-I-Pflanzen

Als Beispiel für die Aufnahme der Strategie-I-Pflanzen wird hier der Mechanismus von *Arabidopsis thaliana* näher erläutert (Abbildung 1 a), welche allgemein und in dieser Arbeit im Speziellen als Modellorganismus verwendet wird.

Neben zahlreichen morphologischen Veränderungen wie z.B. Verkürzung und Verdickung der Wurzel, Ausbildung von mehr Lateralwurzeln mit spezifischen Transferzellen und Wurzelhaaren sowie einer Erhöhung der Citrat-Konzentration im Phloem (Schmidt, 1999), müssen Pflanzen, wie schon beschrieben, zuerst das Löslichkeitsproblem des Eisens (Fe^{3+}) im Boden lösen. Dafür können sie aktiv den pH-Wert in der Rhizosphäre absenken und so die Löslichkeit erhöhen. Dafür transportiert die Plasmamembran-lokalisierte *Arabidopsis* H^+ -ATPase (AHA2) (Santi & Schmidt, 2009; Fuglsang et al. 2007; Schmidt, 2006) unter ATP-Verbrauch Protonen in die Rhizosphäre und senkt effektiv den pH-Wert innerhalb von Stunden bis pH 3,0 (Bienfait, 1985). Zusätzlich können Pflanzen organische Säuren und phenolische Verbindungen (sogenannte *iron-binding compounds* - IBCs). Die IBCs werden in *Arabidopsis* über PDR9 in den Apoplasten transportiert wo sie Eisen (Fe^{3+}) chelatieren können (Rodríguez-Celma et al. 2013 a; Marschner & Römheld, 1994). Die gelösten Fe^{3+} Ionen/Chelate diffundieren an die Plasmamembran und werden durch die NADPH abhängige *Arabidopsis* Fe^{3+} -Chelat-Reduktase (FRO2) zu Fe^{2+} reduziert (Jain et al. 2014; Connolly et al. 2003; Robinson et al. 1999). FRO2 ist ein integrales Membranprotein, das zu einer Familie

von Proteinen gehört, welche Elektronen von zytosolischem NADPH und FAD über zwei Häm-Gruppen auf extrazelluläre Elektronenakzeptoren (Fe^{3+} gebunden an Huminsäuren, organische Säuren oder phenolische Verbindungen) übertragen und Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduzieren (Waters et al. 2002; Robinson et al. 1999). Das reduzierte Eisen wird über den *Arabidopsis* Eisentransporter IRT1 (*iron-regulated transporter 1*) über die Plasmamembran in die Epidermiszellen der Wurzel transportiert (Eide et al. 1996). IRT1 ist auch in der Lage Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} und Cd^{2+} Ionen in die Zellen zu transportieren (Korshunova et al. 1999; Rogers et al. 2000). Er gehört zur Familie der ZIP-Transporter (*zinc-regulated transporter* (ZRT) *iron-regulated transporter like proteins*, ZIP) (Mäser et al. 2001). Sowohl die Expression von *IRT1*, wie auch die von *FRO2* werden in *Arabidopsis* unter Eisenmangel induziert (Vert et al. 2002; Waters et al. 2002; Robinson et al. 1999; Eide et al. 1999). Für IRT1 konnte außerdem ein Abbau bzw. eine Monoubiquitin abhängige Endozytose bei Anwesenheit von ausreichend Eisen gezeigt werden (Barberon et al. 2011; Connolly et al. 2002). Die Regulation der Expression von *IRT1* und *FRO2* erfolgt über ein Heterodimer gebildet aus den *Arabidopsis* basic-Helix-Loop-Helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren FIT (*Fe-deficiency Induced Transcription Factor*) (Colangelo & Guerinot, 2004) und bHLH38, bHLH39, bHLH100 oder bHLH101. Die Faktoren werden unter Eisenmangel verstärkt exprimiert und wirken als Heterodimer direkt auf die Promotoren von *IRT1* und *FRO2* (Wang et al. 2013; Yuan et al. 2008).

1.1.2.2 Strategie-II-Pflanzen

Strategie-II-Pflanzen (Abbildung 1a) zu denen die Gräser und somit einige der wichtigsten Kulturpflanzen wie z.B. Mais, Weizen und Gerste gehören, haben einen pH-Wert unabhängigen Eisenaufnahme-Mechanismus entwickelt. Sie scheiden über den Plasmamembran lokalisierten Transporter TOM1 (*transporter of mugineic acid 1*) (Nozoye et al. 2011) sogenannte Phytosiderophore (PS), Vertreter der Muginsäure-Familie, aus (Römheld & Marschner, 1986; Takagi et al. 1984; Takagi, 1976). Die Biosynthese der PS geht von drei Molekülen S-Adenosyl-Methionin aus, welche in Nicotianamin (NA) integriert werden (Negishi et al. 2002). Die PS komplexieren extrazelluläres Fe^{3+} und die Fe^{3+} -PS-Komplexe werden über den YS1-Transporter (*yellow-stripe*) in die Zelle transportiert (Curie et al. 2001).

Die Eisenaufnahme in Reis (*Oryza sativa*) (Abbildung 1b) stellt eine Besonderheit dar und ist eine Kombination aus beiden Strategien. Reis scheidet auch PS aus, welche als PS-Eisen-Komplexe wieder über den OsYSL15 (*yellow stripe like 15*) Transporter aufgenommen werden (Inoue et al. 2009). Jedoch ist die PS Konzentration geringer als bei anderen Gräsern

(Mori et al. 1991). Dies erklärt sich durch die zusätzliche Expression von zwei IRT1 ähnlichen Proteinen (OsIRT1 und OsIRT2), welche in der Plasmamembran der Wurzelepidermiszellen lokalisiert sind. Durch diese beiden Transporter kann Reis Fe^{2+} direkt aufnehmen, wenn es in der Rhizosphäre vorhanden ist (Ishimaru et al. 2006; Bughio et al. 2002). Die Regulation der Eisenaufnahme erfolgt über die Transkriptionsfaktoren IRO2, IRO3, IDEF1 und IDEF2 (Hindt & Guerinot, 2012). IRO2 und IRO3 sind Gegenspieler, ihre Expression steigt unter Eisenmangel sowohl im Spross, wie auch in der Wurzel an. IRO2 aktiviert Gene, die für die PS Synthese und Transport notwendig sind. IRO3 wirkt Strang-aufwärts von IRO2 und hemmt typische Eisenmangelantwort-Genen (Ogo et al. 2011; Zheng et al. 2010; Ogo et al. 2006). IDEF1 und 2 sind, wie IRO2, positive Regulatoren, die jedoch selber nicht eisenreguliert sind (Kobayashi et al. 2007; Kobayashi et al. 2003). Sie binden an spezifische Sequenzen (IDE1 und 2 – *iron deficiency responsible element*) im Promotor von typischen Eisenmangelantwort-Genen (z.B. IRO2, YSL15, YSL2, IRT1). Hierbei ist IDEF1 der Hauptakteur, er bindet außerdem direkt Eisen und andere zweiwertige Metalle und übermittelt so den zellulären Eisenstatus. IDEF2 bindet ausschließlich an den Promotor von OsYSL2 (Ogo et al. 2008; Kobayashi et al. 2012).

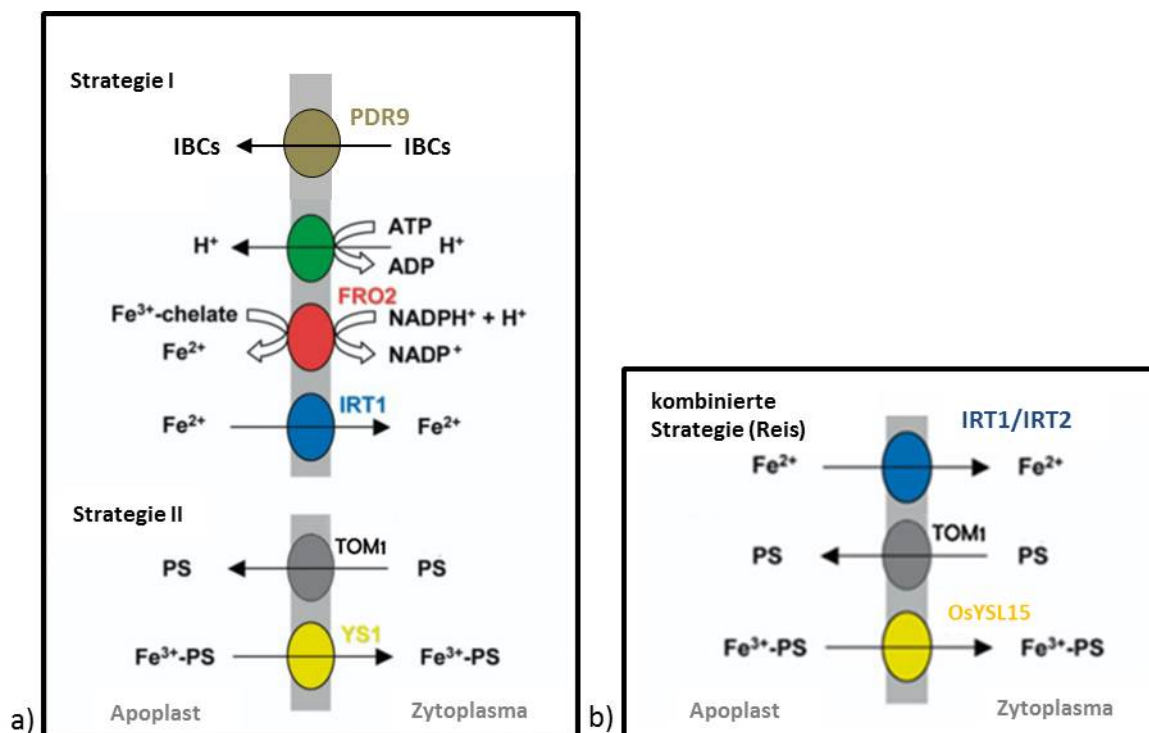


Abbildung 1: Übersicht der Fe-Aufnahmestrategien in Pflanzen; a) Konzept für die Strategie I und II von Römheld & Marschner, 1986, verändert nach Hell & Stephan, 2003, Nozoye et al. 2011 und Rodríguez-Celma et al. 2013a. b) Kombinierte Strategie, vorkommend bei Reis.

1.1.3. Interzellulärer Eisentransport

Nachdem Eisen in die Wurzelzellen aufgenommen wurde, müssen eine Speicherung und ein Transport in die Sink-Organe erfolgen. Dabei müssen Pflanzen und andere Organismen das Problem des gleichzeitigen Bedarfs und der Toxizität des Eisens lösen (Marschner, 1995). In sauerstoffhaltiger Umgebung ist eine zu hohe Konzentration an freiem Fe^{2+} toxisch für die Zellen, da es nach dem Gleichgewicht der Fenton-Reaktion die Bildung von Hydroxylradikalen bewirkt (Halliwell & Gutteridge, 1990). Zusätzlich katalysieren freie Fe^{3+} Ionen die Haber-Weiss-Reaktion bei der aus H_2O_2 und $\bullet\text{O}_2^-$ ebenfalls Hydroxylradikale entstehen (Kehrer, 2000). Hydroxylradikale reagieren mit Lipiden, Proteinen und DNA und zerstören diese (Marschner, 1995). Um das zu vermeiden, wird Eisen in den Zellen bevorzugt an Nicotianamin (NA) gebunden (von Wiren et al. 1999). NA ist eine nicht-proteinogene Aminosäure, die in allen Zellen, unabhängig von der vorhandenen Metall-Ionen-Konzentration synthetisiert wird (Scholz et al. 1992). NA bindet sowohl Fe^{2+} wie auch Fe^{3+} , dabei hat es für Fe^{3+} eine höhere Affinität, geht aber mit Fe^{2+} stabilere Komplexe ein (von Wiren et al. 1999). Der Langstreckentransport von Eisen erfolgt vorwiegend im Xylem, dafür werden die Fe^{2+} -NA Komplexe über die Plasmodesmata des Wurzelsymplasten zum Xylem transportiert (Stephan et al. 1996). Der genaue Transportmechanismus und wie das Eisen ins Xylem abgegeben wird, ist noch nicht geklärt. Für *Arabidopsis* wird AtIREG1/FPN1 (*iron regulated gene 1*), als mögliches Transportprotein diskutiert. Es ist in der Plasmamembran der Stelenzellen lokalisiert (Morrissey et al. 2009). Unterstützt wird diese Vermutung durch das Vorhandensein von Ferroportin1 (FRN1), einem Homolog von IREG1 in tierischen Zellen, wo es Eisen durch die basolaterale Membran der Enterozyten transportiert (Hamada et al. 2008; McKie et al. 2000; Abboud & Haile, 2000). Im Xylem wird das Eisen oxidiert und an Citrat gebunden transportiert (Tiffin, 1966). Citrat selbst wird separat durch FRD3 (ferric reductase defective 3) ins Xylem transportiert (Durrett et al. 2007; Green & Rogers, 2004; Rogers & Gueriot, 2002). Nach der Entladung ins Xylemparenchym erfolgen wieder eine Reduktion des Eisens und eine Bindung an NA für den Transport ins Blattgewebe bzw. ins Phloem (Stephan & Scholz, 1993). Der Transport von Eisen in viele Sink-Gewebe wie Blüten, Samen und Früchte muss über das Phloem erfolgen, da es in diesen Geweben keinen Transpirationssog gibt (Grusak, 1994). Die Be- und Entladung des Phloems mit den Fe^{2+} -NA Komplexen wird über Vertreter der *yellow-stripe-like* (YSL) und Oligopeptid Transporter (OPT) Familie gewährleistet (Curie et al. 2009; Haydon & Cobbett, 2007). *Arabidopsis* hat acht verschiedene YSL Proteine, deren unterschiedliche Funktionen wahrscheinlich in deren Lokalisierung festgelegt sind (Koike et al. 2004; DiDonato et al. 2004). YSL1-3 werden im

Xylemparenchym von Blättern exprimiert, ihnen wird die Translokation von Fe^{2+} -NA vom Xylem zum Phloem zugeordnet (Briat et al. 2007). YSL1 und 3 sind an der Plasmamembran lokalisiert, sie sind wichtig für den Transport von Metallen in sich entwickelnden Samen (Chu et al. 2010; Waters et al. 2006). AtOPT3 ist ein Phloem-spezifischer Transporter. Er wird im Phloem der kleinen Venen in den Blättern und in den Knoten des Stängels exprimiert, wo er in der Plasmamembran der Geleitzellen lokalisiert ist (Zhai et al. 2014; Mustroph et al. 2009). Dort transportiert er $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{2+}$ -NA Komplexe in das Phloem, möglicherweise direkt vom Xylem zum Phloem. Außerdem ist OPT3 entscheidend für die Regulation des Eisenhaushaltes innerhalb der ganzen Pflanze. Er transportiert Eisen innerhalb des Phloems und sorgt so für die Umverteilung von Source- zu Sink-Geweben und somit auch für einen Rücktransport in die Wurzel, was wiederum als Signal für den aktuellen Eisenstatus aufgenommen wird (Zhai et al. 2014). AtYSL2 wurde nur in den lateralen Membranen von Parenchymzellen gefunden, so dass diesem Protein eine Rolle beim lateralen Transport von Metall-NA-Komplexen innerhalb der Blattvenen zugesprochen wird (Koike et al. 2004; DiDonato et al. 2004). Außerdem wurden AtYSL4 und AtYSL6 Proteine im Proteom von *Arabidopsis* Vakuolen gefunden (Jaquinod et al. 2007), so dass sie wohl eher eine Aufgabe im intrazellulären Transport übernehmen. Conte et al. konnten zeigen, dass sie unter Eisenmangel eher Mangan und Nickel in die Vakuole transportieren und so die gesteigerte Metall-Aufnahme durch IRT1 kompensieren (Conte et al. 2013).

1.1.4. Intrazellulärer Eisentransport und Speicherung

In den verschiedenen Organen muss das Eisen innerhalb der Zellen in die entsprechenden Organellen transportiert werden, um dort seine jeweilige Funktion zu erfüllen. Dabei muss auch hier eine exakt regulierte Speicherung erfolgen, um toxische Schäden durch freies Eisen zu vermeiden.

Wie man durch die Untersuchung von zahlreichen *knockout* und *knockdown* Mutanten feststellen konnte, ist Eisen für viele wichtige intrazelluläre Stoffwechselprozesse, wie z.B. die Photosynthese, Chlorophyllbiosynthese (Briat et al. 1995), Hämbiosynthese und die Bildung von Eisen-Schwefel-Clustern essentiell (Terry & Abadia, 1986). Ca. 80 % oder mehr des Gesamteisens wird in den meisten Pflanzen an Ferritin gebunden (Briat, 1999) und in den Chloroplasten der Blattzellen, gespeichert (Terry & Abadia, 1986). Ferritine sind multimere Proteinkomplexe aus 24 Untereinheiten, die bis zu 4500 Eisenatome speichern können und hauptsächlich in den Plastiden von Wurzel und Spross synthetisiert werden (Hell & Stephan, 2003; Briat, 1999). Allgemein gilt für die Ferritine, dass sie die Eisenkonzentration im jeweiligen Organ/Organell puffern und so die Zellen vor oxidativem Stress schützen, jedoch

nicht für die Entwicklung oder Funktion der Chloroplasten wichtig sind (Ravet et al. 2009). Wie unter 1.1.1 beschrieben, benötigen die Chloroplasten ausreichend Eisen, um die Photosynthese aufrecht zu erhalten. Für den Transport des Eisens in die Chloroplasten wird Fe^{3+} wahrscheinlich durch die an der Chloroplastenmembran lokalisierte Reduktase FRO7 zu Fe^{2+} reduziert (Jeong et al. 2008), welches anschließend über PIC1 (*permease in chloroplasts 1*) in die Chloroplasten transportiert wird (Duy et al. 2007; Teng et al. 2006). Neben den Blättern benötigen auch die Blüten Eisen, um z.B. eine bestimmte Blütenfärbung zu erreichen (Yoshida & Negishi 2013; Momonoi et al. 2009), aber vor allem, um die Samen mit einem ausreichenden Depot an Eisen für die zukünftige Keimung zu versorgen. In den Samen allgemein und bei *Arabidopsis* im Speziellen erfolgt die Speicherung von Eisen jedoch zum Großteil in der Vakuole (Lanquar et al. 2010; Kim et al. 2006 b). In *Arabidopsis thaliana* wird nur 5 % des Eisens an Ferritin gebunden gespeichert (Ravet et al. 2009). Für den Transport von Eisen durch die Vakuolenmembran wurden mehrere Transportproteine in *Arabidopsis* identifiziert, deren Funktion sich in ihrer Lokalisation unterscheiden. Das Ferroportin Homolog FPN2, auch bekannt als IREG2, wird hauptsächlich in den Epidermiszellschichten der Wurzel exprimiert und transportiert neben Cobalt auch Eisen aus dem Zytosol in die Vakuole (Morrissey et al. 2009; Schaaf et al. 2006). VIT1 (Kim et al. 2006 b), ein Homolog zu dem aus Hefe bekannten vakuolärem Eisen/Mangan- Importer CCC1p (Li et al. 2001), transportiert ebenfalls Eisen (Fe^{2+}) in die Vakuole. Besonders aktiv ist dieser Transporter im Xylemparenchym von sich entwickelnden Embryonen. Die *knockout* Mutante *vit1-1* zeigt zwar keinen veränderten Eisengehalt in den Samen im Vergleich zum Wildtyp, jedoch eine Verschiebung in der Lokalisation und ein stark gehemmtes Wachstum von Keimlingen auf kalkhaltigen Böden (Kim et al. 2006 b). Weitere Orthologe von VIT1 konnten auch in anderen Spezies identifiziert werden, wo sie aufgrund ihres Expressionsortes verschiedene Funktionen erfüllen, z.B. Blütenfärbung: TgVit1 (Momonoi et al. 2009) und CcVIT1 (Yoshida & Negishi, 2013), die Verteilung von Eisen und Zink zwischen den Source- und Sink-Geweben regulieren (OsVIT1 und OsVIT2) (Zhang et al. 2012) oder innerhalb der Wurzelknöllchen von Leguminosen den Eisen-/Metall-Transport von Wirtszelle zu Bakteroid über die symbiosome Membran ermöglichen (SEN1) (Hakoyama et al. 2012). Der Export aus der Vakuole erfolgt durch die zwei redundant wirkenden Proteine Nramp3 und Nramp4. Die Doppelmutante *nramp3/nramp4* zeigt ein vermindertes Wachstum der Keimlinge in den ersten fünf Tagen der Keimung unter Eisenmangelbedingungen, da sie kein Eisen aus der Vakuole mobilisieren kann (Lanquar et al. 2005). Das Eisen in der Vakuole liegt wahrscheinlich gebunden an Phytat oder NA vor (Morrissey & Guerinot, 2009; Jiang et al.

2001). Auch die Mitochondrien sind eisenverbrauchende Organellen, die demnach einen Transport und eine Speicherung gewährleisten müssen (Briat et al. 2007). Besonders die Mitochondrien in Energie-verbrauchenden Organen, wie den Blättern und Blüten, benötigen eine höhere Konzentration an Eisen, da es essentiell für den Ablauf der Atmungskette und die Bildung von Eisen-Schwefel Clustern ist (Rouault & Tong, 2005). Der Import von Eisen erfolgt wahrscheinlich als Fe^{2+} , da sowohl die Reduktasen FRO3 (Guerinot, unpubliziert), wie auch FRO8 (Heazlewood, 2004) im Mitochondrienproteom gefunden wurden (siehe Modell (Jeong & Guerinot, 2009). Der eigentliche Transporter ist bis heute nicht bekannt. Der Export von Eisen, Eisen-Schwefel-Clustern und anderen Metallkomplexen erfolgt in *Arabidopsis* durch ATM3 (Kim et al. 2006 a). Neben ATM3 wurden zwei weitere Vertreter (ATM1 und ATM2) der ABC-Transporter Familie in der *Arabidopsis stal* Mutante (*knockout* von *atm3*) gefunden, weswegen ATM3 auch als STA1 bekannt ist (Chen et al. 2007; Rouault & Tong, 2005; Kushnir et al. 2001). Alle drei Proteine besitzen N-terminal eine mutmaßliche Zielsequenz für die Mitochondrien. Die Speicherung des Eisens erfolgt gebunden an Ferritin und Frataxin (Santambrogio et al. 2007; Levi & Arosio, 2004; Zancani et al. 2004). Frataxin kommt bevorzugt in den Mitochondrien von Blüten vor (Busi et al. 2004). Interessanterweise ist es nicht Eisen-reguliert, aber ein Fehlen führt zur Embryoletalität (Vazzola et al. 2007; Busi et al. 2006). Für Ferritin wurden in *Arabidopsis* vier Gene identifiziert (Murgia et al. 2007). Alle *FER* Gene besitzen N-terminal ein Transitpeptid für die Plastiden. *AtFER2*, welches als einziges nicht über die Eisen-, sondern die Abscisinsäure (ABA)-Konzentration reguliert wird, kommt hauptsächlich in den Samen vor. *AtFER1* wird spezifisch in den Wurzeln exprimiert, ist aber wie *AtFER3* und *4* auch im Spross und den Blüten zu finden. Für *AtFER1* und sein Ortholog in Mais *ZmFER1* konnte gezeigt werden, dass sie im Promotor eine 15 bp große Sequenz besitzen (IDRS-*iron dependent regulatory sequence*), über die, entsprechend des Eisenstatus, die Expression reguliert wird. Unter Eisenmangel kommt es zu einer transkriptionellen Repression. Ähnliche Sequenzen wurden auch in den Promotoren von *FER2-4* gefunden, jedoch ist nicht klar, ob sie funktionell sind. Außerdem findet man in allen Promotorsequenzen eine G-Box, die eventuell eine ähnliche Funktion übernimmt (Petit et al. 2001 a; Petit et al. 2001 b).

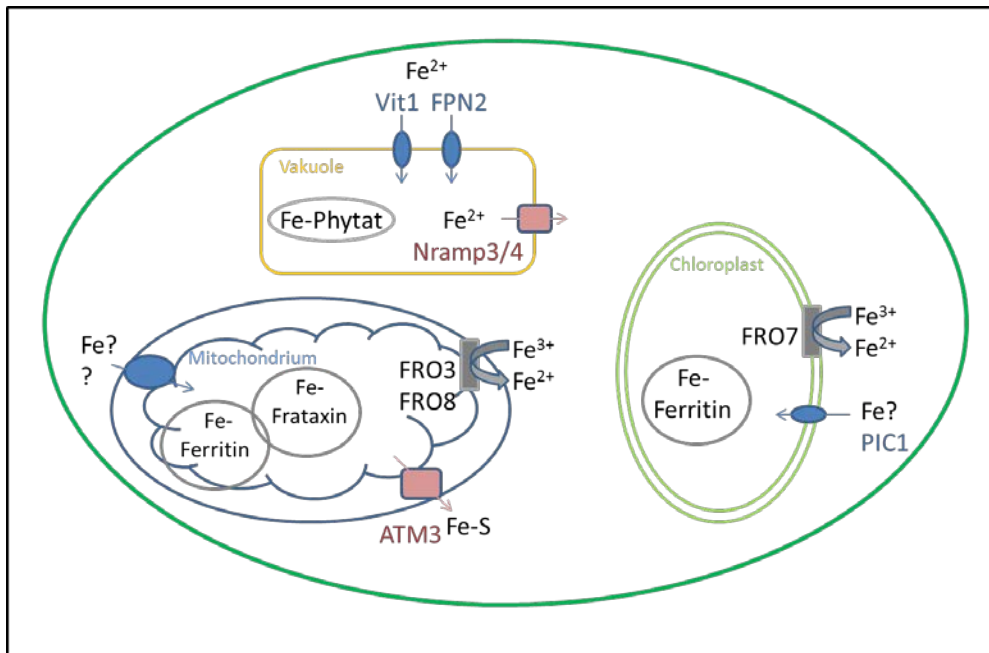


Abbildung 2: Darstellung der Eisentransporter und Eisenspeicherung innerhalb einer Pflanzenzelle.

1.1.5. Regulation der Eisenhomöostase und Signalweiterleitung

Wie beschrieben, können Pflanzen Eisen aus verschiedenen Reservoiren wie dem Apoplasten (Jin et al. 2007; Bienfait et al. 1985), Ferritin (Murgia et al. 2007; Hintze & Theil, 2006), Vakuolen (Lanquar et al. 2010; Kim et al. 2006 b) und älteren Organen (Uauy et al. 2006) mobilisieren, bzw. direkt aus dem Boden aufnehmen, um ihren jeweiligen Bedarf zu decken. Dafür sind jedoch die Weiterleitung von Signalen und das Vorhandensein von Sensoren notwendig. Noch sind viele Aspekte des Eisen-Regulationsmechanismus in Pflanzen unbekannt, aber es wurden verschiedene Phytohormone und Signalmoleküle identifiziert, die in die Eisen-Antwort integriert sind. So konnte z.B. für die Phytohormone Auxin (Romheld & Marschner, 1981; Chen et al. 2010), Abscisinsäure (ABA) (Lei et al. 2014) und Ethylen (Li & Li, 2004; Romera et al. 1999), sowie für NO (Graziano & Lamattina, 2007) gezeigt werden, dass ihre Konzentration unter Eisenmangel ansteigt, was eine Expressionserhöhung von Eisenmangelantwort-Genen bewirkt. Ethylen (Lingam et al. 2011; García et al. 2010) und NO (Yang et al. 2013; Meiser et al. 2011; Chen et al. 2010) regulieren z.B. FIT sowohl auf der transkriptionellen, wie auch auf der posttranslationellen Ebene und somit indirekt die Expression von *IRT1* und *FRO2*. Unter Eisenmangel und unter Einwirkung von NO steigt die Expression von *FIT* in den Wurzelepidermiszellen an (Meiser et al. 2011; Colangelo & Gueriot, 2004; Jakoby et al. 2004). FIT liegt zu ca. 90 % in einer inaktiven Form vor, welches unter Eisenmangel in die aktive Form umgewandelt wird und dann durch Heterodimerbildung mit bHLH38, bHLH39, bHLH100 oder bHLH101 die Expression von *IRT1* und *FRO2* aktiviert (siehe 1.1.2.1). Zusätzlich unterliegt das FIT Protein der Regulation

durch proteasomalen Abbau durch das 26S Proteasom. Dies bewirkt die Entfernung von FIT von seinen Zielpromotoren und somit eine verringerte Expression von *IRT1* und *FRO2*, ermöglicht aber auch die Initiation neuer Transkriptionszyklen bei anhaltendem Eisenmangel (Sivitz et al. 2011). Auf der anderen Seite wird FIT durch NO und indirekt Ethylen stabilisiert. Innerhalb des Ethylen Signalweges kommt es zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren EIN3 und EIL1 (Chao et al. 1997), welche ebenso wie NO mit FIT interagieren und so den Abbau vermeiden (Lingam et al. 2011; Meiser et al. 2011). Auxin steht in Kommunikation mit Ethylen und NO. Auxin selber wird unter Eisenmangel im Spross synthetisiert und vermittelt u.a. als systemisches Auxin Signal eine Eisenmangelantwort in der Wurzel, indem es für eine gesteigerte Expression von Fe^{3+} Reduktasen und eine erhöhte Protonenausschüttung sorgt (Wu et al. 2012; Bacaicoa et al. 2011). Gleichzeitig erhöht Auxin die Synthese von Ethylen und die Produktion von NO und wird selber von beiden beeinflusst (Romera et al. 2011). Abscisinsäure (ABA) ist ein Phytohormon, dessen Konzentration sehr schnell (nach sechs Stunden) in den Wurzeln von *Arabidopsis* ansteigt, wenn diese unter Eisenmangel leiden. Lei et al. konnten zeigen, dass sich unter einer erhöhten ABA Konzentration die Abgabe von Phenolsäuren in den Apoplasten erhöht und sich die apoplastische Eisenkonzentration verringert. Nähere Untersuchungen zeigten, dass das Eisen hauptsächlich aus Pektin und einem Bestandteil der Hemizellulose (HC1) gelöst wird. Zusätzlich erhöht sich die Expression von *Nramp3*, wodurch vakuolär gespeichertes Eisen zur Verfügung gestellt wird. Exogen angewendete ABA erhöht die Eisenkonzentration im Spross und vermindert den Chlorose-Effekt. Auch steigt die Eisenkonzentration im Xylemsaft, aufgrund der erhöhten Expression von *FRD3*, *YSL2* und *NASI*. Zusammenfassend wird vermutet, dass eine erhöhte ABA Konzentration unter Eisenmangel entscheidend ist für Pflanzen, die einen Eisenspeicher besitzen jedoch nicht für völlig ausgehungerte Pflanzen, da ABA die Mobilisierung des Eisens und den Transport von Wurzel zu Spross unterstützt (Lei et al. 2014). Cytokinine scheinen dagegen eine negative Regulation von *IRT1*, *FRO2* und *FIT* zu bewirken. Sie hemmen die Akkumulation der Transkripte, vermittelt durch die Rezeptoren *AHK3* und *CRE1*, jedoch unabhängig vom Eisenstatus in der Zelle. Zusätzlich ist bekannt, dass sie allgemein das Wurzelwachstum hemmen. (Séguéla et al. 2008; Dello Ioio et al. 2007).

García et al. (2012) untersuchten die Kommunikation über den Eisenstatus von Spross zu Wurzel. Sie konnten zeigen, dass eine Eisenbehandlung der Blätter von Pflanzen die unter Eisenmangel leiden zu einer Hemmung der Expression von Eisen-Mangel-Antwort Genen führt (García et al. 2012). Außerdem konnte auch gezeigt werden, dass die Bewegung von

Eisen im Phloem von Spross zu Wurzel entscheidend ist für die Eisenmangelantwort (García et al. 2011; Lucena et al. 2006). Als Signalmolekül bzw. Eisentransporter im Phloem wurde in *Arabidopsis* OPT3 identifiziert (siehe 1.1.3) (Zhai et al. 2014; García et al. 2012; Stacey et al. 2008). Neben OPT3 wurden sechs weitere Gene (*IRP1-6; iron responsive proteine*), deren Expression unter Eisenmangel sowohl in Wurzeln, wie auch im Spross stark hochreguliert ist, entdeckt (Rodríguez-Celma et al. 2013 b). Eine eindeutige Funktion konnte bis heute noch nicht identifiziert werden, jedoch wird für IRP1 (At1g47400) und IRP2 (At1g47395), jetzt IMA1 und IMA2, diskutiert, dass es sich um Regulatoren downstream von FIT1 handelt. Es konnte gezeigt werden, dass IMA1 die Expression von Eisen-Aufnahme Genen erhöht und dass die Überexpression von IMA1 die Eisenkonzentration in Samen und Blättern und die Mangankonzentration in Blättern signifikant erhöht, was zu nekrotischen Phänotypen führt wenn die Pflanzen auf Eisen suffizientem Medium angezogen werden. Dagegen treten die typischen Eisenmangel Anzeichen später und schwächer auf, was auf die verstärkte Speicherung von Eisen im Samen zurückzuführen ist (Wolfgang Schmidt, persönliche Mitteilung; Lan, unveröffentlichte Daten).

Zusammenfassend scheint für das Feintuning der Eisenmangelantwort ein Zusammenwirken von aktivierenden (z.B. Auxin, Ethylen, NO) und hemmenden Signalen (z.B. Cytokinine und Eisen), sowie Sensoren und Transportern (OPT3) notwendig zu sein, die selber u.a. vom Eisenstatus im Phloem reguliert werden.

1.2. *VTL*-Gene, weitere potentielle Eisentransporter

Innerhalb einer Microarray-Analyse, beruhend auf dem Vergleich der mRNA-Abundanz aus *Arabidopsis thaliana* Wurzeln von Pflanzen die unter Normal- und Eisenmangelbedingungen angezogen wurden, konnten neben vielen anderen bekannten und unbekannten Genen, drei Gene (At3g25190, At1g21140 und At1g76800) identifiziert werden, deren Expression unter Eisenmangel abnimmt (Yang et al. 2010; Buckhout et al. 2009). Eines dieser Gene At3g25190 (jetzt *VTL5*) wurde als *nodulin-like21* in der *Arabidopsis* Datenbank (www.arabidopsis.org) annotiert. Gene der Nodulin-Familie sind an der Bildung der Wurzelknöllchen (engl.: *nodules*) bei Leguminosen beteiligt (Govers et al. 1985) oder haben Sequenzähnlichkeiten zu diesen. Proteine mit einer signifikanten Sequenzhomologie zum Nodulin-like21-Protein sind weit verbreitet und sowohl in mono- und dikotyledonen Pflanzen, *Chlamydomonas* und *Physcomitrella*, wie auch in vielen Prokaryoten, jedoch nicht in Tieren zu finden (Gollhofer et al. 2011). Für die drei Gene konnte eine eisenabhängige Regulation durch ILR3 gezeigt werden. ILR3 kodiert für einen bHLH Leucin Zipper (bHLH105)

(Rampey et al. 2006). Entscheidend für die Wirkung von ILR3 sind auch der Transkriptionsfaktor Popeye (Pye) und die E3-Ubiquitin-Protein-Ligase, Brutus (BTS), welche unter Eisenmangel hochreguliert sind und wichtige Regulatoren in der Eisenhomöostase in Blättern und Wurzeln darstellen (Long et al. 2010; Buckhout et al. 2009). Popeye wirkt direkt als positiver Regulator auf einige Gene (z.B. *FRO3*, *NAS4*, *IRT1*, *OPT3*, *FRD3*), welche in die Regulation der Eisenhomöostase unter Eisenmangel integriert sind und bildet Heterodimere mit ILR3 oder einem von zwei weiteren Transkriptionsfaktoren bHLH115 (OYL) oder bHLH104, welche wiederum mit BTS interagieren. BTS wirkt als negativer Regulator auf die gleichen Gene wie PYE. Beide Proteine scheinen als Gegenspieler entscheidend zu sein für die Erhaltung der Eisenhomöostase unter Eisenmangelbedingungen. PYE, BTS, bHLH115, ILR3 und weitere Transkriptionsfaktoren werden spezifisch im Perizykel exprimiert, so dass vermutet wird, dass der Perizykel als regulatorisches Zentrum des vorhandenen Eisenlevels wirkt (Selote et al. 2015; Long et al. 2010; Dinneny et al. 2008). Die drei gefundenen Gene gehören zu einer kleinen Familie aus fünf Genen. Die putativen Aminosäuresequenzen der Mitglieder zeigen eine signifikante Homologie zu der Sequenz von AtVIT1 und CCC1p aus *Saccharomyces* (Gollhofer et al. 2011; Buckhout et al. 2009). Aufgrund von Ergebnissen aus dieser Arbeit, die sich mit der Identifizierung und Charakterisierung dieser fünf Gene beschäftigt, kam es zu einer Umbenennung in *VTL*-Gene (*Vacuolar Iron Transporter-Like*) (Gollhofer et al. 2014).

1.3. Eisenassimilation in *Saccharomyces cerevisiae*

Da zur Untersuchung der Funktion und Lokalisation der identifizierten Gene in dieser Arbeit Hefezellen allgemein als Modellsystem und verschiedene Hefe-Deletionsmutanten verwendet wurden, wird hier auf die Eisenassimilation in Hefen eingegangen.

1.3.1. Eisenaufnahme in Hefezellen

Für die Aufnahme von Eisen in Hefezellen konnten mehrere verschiedene Transportwege/systeme identifiziert werden (Radisky & Kaplan, 1999), deren Bedeutung je nach Lebensraum variiert. Unter anaeroben Bedingungen transportiert der niedrigaffine Fet4p Transporter Fe^{2+} durch die Plasmamembran in die Zelle (Dix et al. 1997; Dix et al. 1994). Dafür wird das extrazelluläre Fe^{3+} durch die membranlokalisierten Reduktasen Fre1p (Dancis et al. 1990) und Fre2p (Georgatsou & Alexandraki, 1994) reduziert. Im Gegensatz zu Fre2p wird Fre1p nicht nur durch die Transkriptionsfaktoren Aft1p und Aft2p, sondern auch über die Kupferkonzentration reguliert (Radisky & Kaplan, 1999). Neben Fet4p können auch Smf1p und Smf2p, Protonen abhängig, Fe^{2+} durch die Plasmamembran transportieren (Chen

et al. 1999; Li & Kaplan, 1998). Smf1p ist jedoch hauptsächlich für den Mangantransport verantwortlich (Eguez et al. 2004; Supek et al. 1996). Wesentlich effektiver, aber nur unter aeroben Bedingungen aktiv (Hassett et al. 1998) ist das Fet3p/Ftr1p Transportsystem. Das von Fre1p reduzierte Eisen wird durch Fet3p (Multikupferoxidase) wieder zu Fe^{3+} oxidiert (Askwith et al. 1994) und dann von dem hoch affinen Transporter Ftr1p in die Zelle transportiert (Kwok et al. 2006). Fet3p und Ftr1p bilden vermutlich einen Komplex in der Plasmamembran und sind einzeln nicht funktionell (Singh et al. 2006; Stearman et al. 1996). Interessanterweise wurde auch entdeckt, dass durch eine Mutation im *CTR1p* Gen, welches für einen Plasmamembran-lokalisierten Kupfer-Transporter kodiert (Dancis et al. 1994), die hochaffine Eisenaufnahme verhindert wird. Spätere Untersuchungen zeigten, dass Fet3p und Fre1p Kupfer als Kofaktor benötigen (Eide, 1998). Dieser hochaffine Mechanismus ist eine gute Methode viel Eisen löslich zu machen und trotzdem die toxische Wirkung des Fe^{2+} effektiv zu minimieren (Eide, 1998).

Zusätzlich zu diesen Mechanismen sind Hefen in der Lage Eisen-Siderophore (Fe-PS) mit Hilfe der Transporter Arn1p, TAF1p und Sit1p aufzunehmen (Kosman, 2003; Heymann et al. 1999; Lesuisse et al. 1987). Dabei können sie selbst keine Siderophore synthetisieren, sondern nur die von anderen Organismen (z.B. anderen Pilzen) nutzen (Lesuisse et al. 1998). Die Kombination all dieser Eisen-Aufnahme-Mechanismen ermöglicht es den Hefen, sehr viele Lebensräume unterschiedlichster Art zu besiedeln.

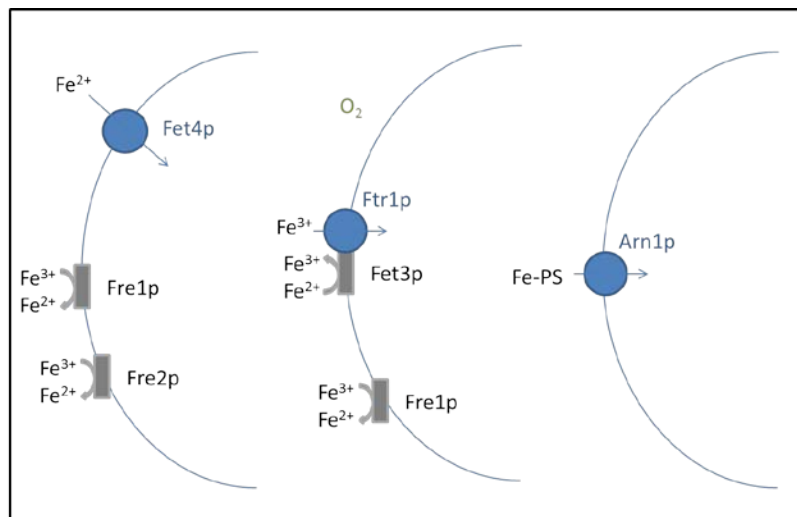


Abbildung 3: Zusammenfassung der Eisen-Aufnahme-Mechanismen in Hefezellen.

1.3.2. Regulation der Eisenaufnahme in Hefezellen

Aft1p und Aft2p sind paraloge Transkriptionsfaktoren in *Saccharomyces cerevisiae*, die selber eisenreguliert sind und unter Eisenmangel die Expression von mehr als 25 Genen (z.B. *Fre1p*, *Fre2p*, *Fet3p*, *Ftr1p* usw.) aktivieren, deren Produkte entscheidend für die Regulation der Eisenhomöostase sind (Blaiseau et al. 2001; Rutherford et al. 2001; Yamaguchi-Iwai et al. 1996; Yamaguchi-Iwai et al. 1995). Aft1p und Aft2p haben sowohl überlappende, wie auch separate Zielgene, die aber alle eine konservierte Sequenz (Fe-RE, *iron responsive element*) im Promotor besitzen. Die Spezifität wird durch die angrenzenden Sequenzen gewährleistet (Courel et al. 2005; Rutherford et al. 2003; Yamaguchi-Iwai et al. 1996). Unabhängig von der Eisenkonzentration wird Aft1p und wahrscheinlich auch Aft2p von Pse1p in den Kern transportiert (Ueta et al. 2003), wo sie unter Eisenmangel an die entsprechenden Promotorsequenzen binden. Bei ausreichender Eisenversorgung der Zelle, kommt es zu einer Hemmung von Aft1p und Aft2p, die von Grx3, Grx4, Fra2 und Fra1 über Fe-S Cluster vermittelt wird (Ueta et al. 2012; Kumánovics et al. 2008; Ojeda et al. 2006; Pujol-Carrion et al. 2006; Rutherford et al. 2005). Die Fe-S Cluster werden in den Mitochondrien synthetisiert und als noch unbekanntes Substrat über Atm1p ins Zytosol transportiert (Kispal et al. 1997). Grx3 und Grx4 bilden durch Bindung von Fe-S Clustern Homodimere, die vermutlich mit Fra2 Heterodimere bilden und so das Signal auf Aft1p und Aft2p übertragen. Die Interaktion von Grx3/4 mit Aft1/2p vermittelt die Dissoziation vom Promotor (Poor et al. 2014; Mühlhoff et al. 2010; Li et al. 2009; Kumánovics et al. 2008). Aft1/2p werden von Msn5p aus dem Kern exportiert und somit eine erneute DNA-Bindung vermieden (Ueta et al. 2007). Für Aft2p konnte außerdem *in vivo* gezeigt werden, dass er direkt Fe-S Cluster oder Fe^{2+} binden kann, wodurch es zu einer Dimerisierung kommt, die die DNA-Bindung verringert (Poor et al. 2014). Zusätzlich ist die Kupferhomöostase ein essentieller Regulator für die hochaffine Eisenaufnahme. So wird z.B. *Fre1p* neben der Regulation durch Aft1/2p, unter Kupfermangel auch durch den Transkriptionsfaktor Mac1p reguliert (Martins et al. 1998; Georgatsou et al. 1997). Außerdem besitzt die Multikupferoxidase Fet3p vier Kupferatome (Askwith et al. 1994).

1.3.3. Intrazellulärer Eisentransport und Speicherung in Hefezellen

Im Gegensatz zu Pflanzen synthetisieren Hefen kein Ferritin. Als wichtigstes Speicherorganell wurde hier die Vakuole identifiziert (Li et al. 2001). Dafür sprechen mehrere Argumente: 1. Zellen mit mutierten, funktionslosen Vakuolen zeigen eine erhöhte Metallsensibilität (Szczyepka et al. 1997; Bode et al. 1995), 2. Der Vakuolenmembran-lokalisierte Eisen/Mangan-Importer CCC1p konnte identifiziert werden (Li et al. 2001),

3. Eisen (Fe^{3+}) gebunden an Phosphat wurde in den Vakuolen gefunden (Bode et al. 1995; Raguzzi et al. 1988) und die Vakuolenmembran-lokalisierten Eisen-Exporter Fth1p (Urbanowski & Piper, 1999) und Smf3p (Portnoy et al. 2002; Portnoy et al. 2000) wurden identifiziert.

CCC1p transportiert Fe^{2+} aus dem Zytosol in die Vakuole, was durch eine erhöhte Eisenkonzentration in den Vakuolen nach Überexpression von CCC1p gezeigt werden konnte. Außerdem sind Δccc1p Mutanten sensitiv gegenüber einer erhöhten Eisenkonzentration im Medium und zeigen eine verminderte Wachstumsfähigkeit (Li et al. 2001). Das importierte Eisen wird durch Fet5p zu Fe^{3+} oxidiert (Kosman, 2010; Urbanowski & Piper, 1999) und als Eisen-Phosphat-Hydrat-Komplex gespeichert (Bode et al. 1995; Raguzzi et al. 1988). Durch das gespeicherte Eisen sind Hefen in der Lage über mehrere Generationen auf eisenfreiem Medium zu wachsen. Dafür mobilisieren sie Eisen durch den Smf3p Transporter, der Fe^{2+} aus der Vakuole transportiert (Portnoy et al. 2002). Unter Normalbedingungen transportiert bevorzugt Fth1p Fe^{3+} aus der Vakuole ins Zytosol (Kosman, 2010; Urbanowski & Piper, 1999). Für die Mobilisierung des gebundenen Fe^{3+} benötigt man eine kurzweilige Reduktion zu Fe^{2+} , was durch die Metall-Reduktase Fre6p katalysiert wird (Singh et al. 2007).

Der Eisenimport in die Mitochondrien erfolgt durch die beiden homologen Transporter Mrs3p und Mrs4p (Mühlenhoff et al. 2003). Dort wird Eisen gebunden an Yfh1p gespeichert (Babcock et al. 1997), bzw. zu den eisenverbrauchenden Komplexen transportiert (Bulteau et al. 2004). Der Export von Fe-S-Clustern wird vermutlich von ATM1p katalysiert, welcher an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist und ein Homolog zu ATM3 aus Arabidopsis darstellt (Kispal et al. 1997; Leighton & Schatz, 1995).

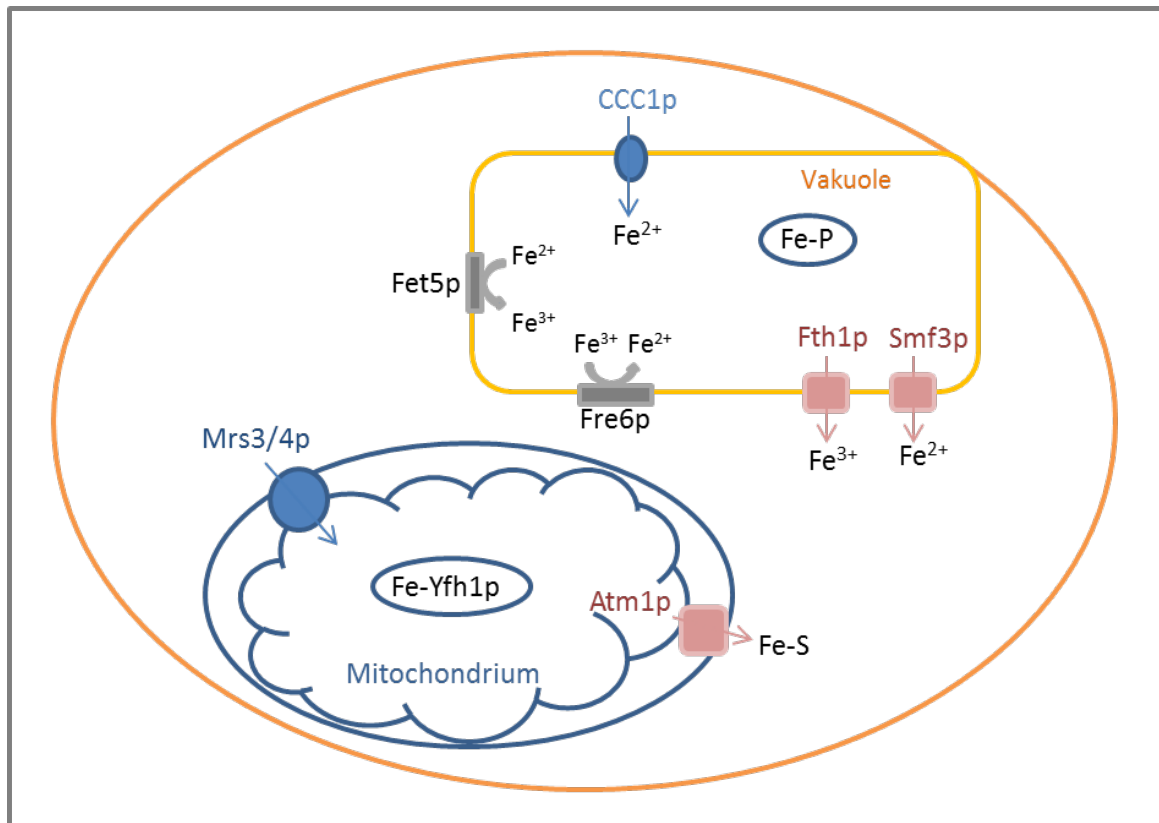


Abbildung 4: Überblick über den intrazellulären Eisentransport und Speicherung in Hefezellen.

1.4. Eisenassimilation in *Chlamydomonas reinhardtii*

Da der Eisenaufnahmemechanismus der Grünalgen eine Kombination der Mechanismen von Strategie-I-Pflanzen und Hefen darstellt und außerdem *VTL* verwandte Gene in *Chlamydomonas reinhardtii* vorkommen, wird hier kurz die Eisenassimilation von *Chlamydomonas reinhardtii* erläutert. *Chlamydomonas reinhardtii* ist eine im Süßwasser lebende einzellige Grünalge, die Chloroplasten besitzt und neben anderen energiebringenden Stoffwechselwegen, wie z.B. Gärung, vor allem Photosynthese betreibt. Ebenso wie höhere Pflanzen, muss sie das Problem der ausreichenden Eisenversorgung bewältigen, wobei in wässriger Umgebung noch die erhöhte Diffusion erschwerend hinzukommt. Eine membranständige Protonen ATPase (PMA2) schleust vermutlich Protonen aus der Zelle (Urzica et al. 2012). Die Fe³⁺ Chelat-Reduktase Fre1 reduziert Fe³⁺ zu Fe²⁺ (Allen et al. 2007; Eckhardt & Buckhout, 1998; Lynnes et al. 1998) welches durch die algenspezifischen Transportproteine FEA1 und FEA2 zum einen für den direkten Transport zu den Eisentransportern IRT1 und IRT2 (Urzica et al. 2012; Allen et al. 2007) und zum anderen zu dem Transportkomplex, bestehend aus FOX1 und FTR1, transportiert wird (Glaesener et al. 2013; Urzica et al. 2012; Narayanan et al. 2011). FOX1 ist eine kupferhaltige Ferroxidase, die Fe²⁺ wieder zu Fe³⁺ oxidiert (Herbik, 2002), welches dann von der Permease FTR1 ins

Zytosol transportiert wird (Terzulli & Kosman, 2010). Die Expression von FOX1 reagiert sehr schnell auf eine sich ändernde Eisenkonzentration im umgebenden Medium, darum gilt FOX1 als guter Marker für den aktuellen zellulären Eisenstatus (Glaesener et al. 2013). Wie in Hefen und *Arabidopsis* ist nicht Ferritin, sondern die Vakuole der Hauptspeicherort für Eisen (Fe^{2+}) (Busch et al. 2008; Long et al. 2008; Semin et al. 2003). Der Transport in die Vakuole erfolgt wahrscheinlich in Form von Fe^{2+} über zwei CCC1-like Proteine (Cre02.g099500 und Cre02.g107550) und FPN1. Wobei FPN1 allgemein zweiwertige Metalle transportiert und eher in den Chloroplasten aktiv ist. Für den Export wurde Nramp4 identifiziert (Urzica et al. 2012).

1.5 Zielsetzung

Getreidesamen liefern mehr als 50 % der weltweit aufgenommenen Energie (Bewley, 1997) und machen einen Großteil der Ernährung vor allem in Entwicklungsländern aus. Auf der Grundlage dessen, ist ein großes Interesse der Nahrungsmittelforschung darauf fokussiert, wie Pflanzen Nährstoffe in die Samen transportieren bzw. wie man diesen Transport erhöhen könnte (Morrissey & Guerinot, 2009).

Betrachtet man den Nährstoff Eisen im speziellen Fall, tritt das Problem auf, dass trotz ausreichendem Eisen im Boden, nur wenig davon genutzt und aufgenommen werden kann und somit pflanzenbasierte Ernährung nur wenig verfügbares Eisen liefert. Das führt dazu, dass ein Großteil der Weltbevölkerung, vor allem in Entwicklungsländern unter Eisenmangel leidet, was Anämie und andere Krankheiten zur Folge hat (De Benoist, World Health Organization, and Centers for Disease Control and Prevention (U.S.) 2008). Mittlerweile ist einiges über die Aufnahme von Eisen aus dem Boden in die Pflanze bekannt, so dass durch gezielte Düngung der Böden die Eisenverfügbarkeit erhöht werden kann. Auch wurden die Eisenmangelantwort von Pflanzen und die Regulation der Homöostase unter Eisenmangel vielfach untersucht und zusammengefasst (Walker & Connolly, 2008; Briat et al. 2007). Doch trotz großer Bemühungen, den molekularen Mechanismus aufzuklären, können einfache und essentielle Fragen z.B.: Wie wird Eisenmangel detektiert? oder: Wie erfolgt die Signalweiterleitung innerhalb der Pflanze?, nicht ausreichend beantwortet werden. Ebenso führt die Überexpression von Genen, die bekanntlich in die Eisenhomöostase integriert sind, oft zur Ansammlung von Eisen in Blättern, jedoch nicht in den Samen (Van Wuytswinkel et al. 1999). Um der Aufklärung des Eisen-Signal-Mechanismus innerhalb der Pflanze und eventuell der Möglichkeit einer Erhöhung der Eisenkonzentration in Samen einen Schritt näher zu kommen, beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit folgenden Aspekten:

- Identifizierung einer neuen Familie von Genen (*VTL*) in *Arabidopsis thaliana*
- Analyse der Expression der *VTL* Gene in Bezug auf Eisenmangel
- Untersuchung der Lokalisation der *VTL* Proteine innerhalb der Zelle und Pflanze
- Charakterisierung der Funktionen der *VTL* Proteine als potentielle Eisentransporter in Pflanzen und Hefen
- Untersuchung einer möglichen Erhöhung der Eisenkonzentration der Samen durch Überexpression der *VTL* Gene

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Tabelle 1: Bezeichnungen und Hersteller der verwendeten Geräte.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Dot-Blotter Apparatur	SRC 96 D	Schleicher& Schüll, Dassel
Feinwaage	CPA 225D	Sartorius AG, Göttingen
Geldokumentationsanlage	Intas UV-System	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Florenz
Gelkammern	Agagel Mini Biometra®	Biomedizinische Analytik GmbH; Göttingen
Konfokalmikroskop	DMIRE 2	Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar
PCR-Cycler	Thermal Cycler C1000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
pH-Meter	Lab 850	Schott Instruments Analytics GmbH, Mainz
Photometer	Novaspec® II	Pharmacia - Freiburg
Retsch®-Mühle	MM400	Retsch GmbH, Haan
Schüttler	KS250 Basic	IKA Labortechnik
Sterilbank	Microflow	W.H. Mahl GmbH, Magdeburg
	Safemate 1.2	Bioair, EuroClone S.p.A., Pero
Thermomixer	MKR 10/13	HLC Biotech, Bovenden
	Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg
	Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg
Waage	510	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Wärmeschränk	-	Nonan
Zentrifugen	1-15PK	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
	TH 12	MLW, Hemmingen
	Biofuge 15	Heraeus Holding GmbH, Hanau

2.1.2. Vektoren

Tabelle 2: Verwendete Vektoren.

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
GL1	Ampr, Ausgangsvektor: pGPTV	(Becker et al. 1992)
pUE1	Ampr, <i>URA3</i> , 2 μ m, PGK-P, PGK-T	(Eckhardt, 2000)
pSAT6-mCherry-C1-B	Ampr	(Gelvin, 2007)
pSAT4-mCherry-N1	Ampr	(Gelvin, 2007)
pGEM-T	Ampr	Promega
pPZP-RCS2-orc-bar-Sma	Spectinomycin / Basta	(Gelvin, 2008)
pCAMBIA 1391-z	Kanamycin/Hygromycin	http://www.cambia.org/daisy/cambia/585.html
pH7YWG2.0-PTR1(PTR1-YFP)	Spectinomycin	Karimi et al. 2002 (unveröffentlicht)
pH7YWG2.0-PTR2(PTR2-YFP)	Spectinomycin	

2.1.3. Primer

Tabelle 3: Verwendete Primer, deren Sequenzen (5'→3'), Länge und Verwendung.

Primer	Sequenz (5'→3')	Länge [bp]	Verwendung
#Actin2-fw	TGGAATCCACGAGACAACCTA	21	Haushaltsgen für semiquantitative PCR
#Actin2-rev	TTCTGTGAACGATTCCTGGAC	21	
#Oligo-dT	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	18	cDNA Synthese
mCherry-fw	GGTGAGCAAGGGCGAGGAGG	20	mCherry-Fusionskonstrukte
mCherry-rev	CCTTGTAGGTGGTCTTGACC	20	
#VTL1-EcoRI-fw	CCAAAAGAATTCACCATGG	19	Überexpression in Hefezellen; Klonierung in pUE1-Vektor und Konstruktion von mCherry-Fusionskonstrukten zur Lokalisation in Pflanzenzellen
#VTL1-PstI-rev	GTTGCCTGCAGCGTGAAGC	19	
#VTL2-EcoRI-fw	GAATTCATGGATCAATCAGG	20	
#VTL2-PstI-rev	CTGCAGTCACAATCCATATAAC	22	
#VTL3-EcoRI-fw	GAATTCCCAAATCTAT TTAAGT	21	
#VTL3-SmaI-rev	CCCGGGTCAACAATACATATG	21	
#VTL4-EcoRI-fw	GAATTCGTCCTAACCATGG	19	
#VTL4-PstI-rev	CTGCAGTCAAAGACCATGTG	20	
#VTL5-EcoRI-fw	GTACGAATTCCAAACCATGAC	21	
#VTL5-SmaI-rev	CCCGGGGATTTCATGGC	18	

#VTL1-SmaI-fw	CCCGGGATGGAATCACACAAC	21	Überexpression in Pflanzenzellen; Klonierung in GL1 Vektor und Konstruktion von mCherry-Fusionskonstrukten zur Lokalisation in Pflanzenzellen
#VTL1-SmaI-rev	CCCGGGTCACAGACTATGTG	20	
#VTL2-SmaI-fw	CCCGGGACAATG GATCCATC	20	
#VTL2-SmaI-rev	CCCGGGTCACAATCCATATAAC	22	
#VTL3-SmaI-fw	CCCGGGATGGAATCTCACAAC	21	
#VTL3-SmaI-rev	CCCGGGTCAACAATACATATG	21	
#VTL4-SmaI-fw	CCCGGGATGGAATCAAACAAC	21	
#VTL4-SmaI-rev	CCCGGGTCAAAGACCATGTG	20	
#VTL5-SmaI-fw	CCCGGGATGACTTCCAACGTT	21	
#VTL5-SmaI-rev	CCCGGGGATTTGCATGGC	18	
#VTL1prom-fw	GACGTTCTCTGCAGATTTC	18	Amplifikation von Promotoren für Konstruktion von Promotor-GUS Konstrukten
#VTL1prom-rev	GTGATTCCATGGTAAAGTC	19	
#VTL5prom-fw	GGACACCTGCAGGGGTTAAC	20	
#VTL5prom-rev	CGTTGGAAGCCATGGTTTGG	20	
#VTL1-qRT-fw	GGCTGCGTTTGTGAAAGACT	20	Real-time-quantitative PCR
#VTL1-qRT-rev	AAAACCCTAGCCGACGACTT	20	
#VTL2-qRT-fw	CTTTTGGCTGCTGCTTTTGT	20	
#VTL2-qRT-rev	CTGCTCCTAACCATCCGAAA	20	
#VTL5-qRT-fw	TGTGGTTAAGTCGAGCGTCA3	20	
#VTL5-qRT-rev	GCAGAGCCAATGAACTTGGT	20	
#Actin2-qRT-fw	TAAGGTCGTTGCACCACCTG	20	
#Actin2-qRT-rev	TGAACGATTCCTGGACCTGC	20	

2.1.4. Lebendmaterial mit entsprechenden Nährmedien

Tabelle 4: Verwendetes Lebendmaterial mit Selektionsfaktor und entsprechendem Nährmedium.

Stamm	Selektion/Herkunft	Nährmedium
<i>Escherichia coli</i> – DH5α	-/ dieses Labor	LB
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> - EAH105	Rifampicin (100 µg/ml)/ dieses Labor	YEB
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> – GV2260	Rifampicin (100 µg/ml)/ Ampicillin (100 µg/ml)/ dieses Labor	YEB
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> - WT DY150	Ura3-52, leu2-3, 112 trp1-1/ Jerry Kaplan	YPD
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> - Δccc1	ura3, leu2, his3, trp1/ Jerry Kaplan	YPD/SD-ura

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> - $\Delta pmr1$	ura3, leu2, his3, trp1/ Jerry Kaplan	YPD/SD-ura
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> - $\Delta smf1$	his3, ade2, leu2, trp1, ura3/ (Thomine et al. 2000)	YPD/SD-ura
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> - $\Delta zrc1$	ura3, leu2, his3, trp1/ Jerry Kaplan	YPD/SD-ura
<i>A. thaliana</i> Wildtyp <i>Columbia</i> (Col-0)	-/ dieses Labor	GS 90
<i>A. thaliana vit1-1</i>	-/ (Kim et al. 2006 b)	Einheitserde/
<i>A. thaliana nramp3/4</i>	Kanamycin (50 µg/ml)/ (Lanquar et al. 2005)	Flüssigkultur/
<i>A. thaliana vtl3</i> (Salk_038597)	Kanamycin/ NASC	ES-Medium
<i>A. thaliana vtl5</i> (Salk_054072)	Kanamycin/ NASC	

2.1.5. Nährmedien

Tabelle 5: Zusammensetzung der Medien.

Name	Zusammensetzung für 1 Liter Medium
GS 90	Einheitserde für <i>A. thaliana</i>
	5 mM KNO ₃
	2 mM Ca(NO ₃) ₂ x 4 H ₂ O
	2 mM MgSO ₄ x 7 H ₂ O
	2,5 mM KH ₂ PO ₄
	14 µM MnCl ₂ x 4 H ₂ O
	70 µM H ₃ BO ₃
	1 µM ZnSO ₄ x 7 H ₂ O
	0,5 µM CuSO ₄ x 5 H ₂ O
Estell & Somerville pH 5,5	0,2 µM NaMoO ₄ x 2 H ₂ O
	0,01 µM CoCl ₂ x 6 H ₂ O
	10 µM NaCl
	40 µM FeSO ₄
	0,1 % MES (w/v)
	1,5 % Saccharose (w/v)
	0,8 % Agar
	Für – Fe, Zugabe von 100 µM Ferrozin
	3 mM KNO ₃
	0,5 mM MgSO ₄ x 7 H ₂ O
	1,5 mM CaCl ₂ x 6 H ₂ O
	1,5 mM K ₂ SO ₄
Flüssigkultur nach Wolfgang Schmidt pH 6,0	1,5 mM NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O
	25 µM H ₃ BO ₃
	1 µM MnCl ₂ x 4 H ₂ O
	0,5 µM ZnSO ₄ x 7 H ₂ O
	0,05 µM (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₄ x 4 H ₂ O

	0,3 μM $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$
	+/- 40 μM $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
LB-Medium	10 g Bacto-Trypton
	5 g Hefeextrakt
	10 g NaCl
	15 g Agar (für Festmedium)
YPD-Medium	20 g Bacto-Peptide
	10 g Hefeextrakt
	2 % Glukose (Zugabe nach dem Autoklavieren)
	20 g Agar (für Festmedium)
SD-Medium	5 g Ammoniumsulfat
	1,066 g <i>Yeast Nitrogen Base without amino acid</i>
	25 % Glukose
	100 ml 10 x AS-Mix (nach dem Autoklavieren)
	20 g Agar (für Festmedium)
YEB-Medium (pH 7,2)	0,1 % (w/v) Bacto Hefeextrakt
	0,5 % (w/v) Bacto Pepton
	0,5 % (w/v) Saccharose
	1 mM $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
	20 g Agar (für Festmedium)
10 x AS-Mix	400 mg/l Adenin
	200 mg/l L-Arginin
	1000 mg/l L-Asparaginsäure
	1000 mg/l L-Glutaminsäure
	200 mg/l L-Histidin
	600 mg/l L-Leucin
	300 mg/l L-Lysin
	200 mg/l L-Methionin
	500 mg/l L-Phenylalanin
	3750 mg/l L-Serin
	2000 mg/l L-Threonin
	400 mg/l L-Tryptophan
	300 mg/l L-Tyrosin
	1500 mg/l L-Valin

2.1.6. Reaktionskits, Enzyme, Antikörper und Fertiglösungen

Tabelle 6: Verwendete Reaktionskits, Enzyme, Antikörper und Fertiglösungen.

Name	Hersteller
<i>Anti-His</i> Antikörper	Cellbiolabs
<i>DNase I, RNase-free</i> -Kit	Fermentas
dNTP Set	Fermentas
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase	Fermentas
FastRuler Middle Range DNA <i>Ladder</i>	Fermentas
GeneRuler™ 1 kb Plus DNA <i>Ladder</i>	Fermentas
GeneRuler™ 100 bp Plus DNA <i>Ladder</i>	Fermentas
Isolate PCR and Gel Kit	Bioline
Mango <i>Taq</i> DNA Polymerase	Bioline
<i>pGEM-T Vector System</i>	Promega
<i>Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase</i>	BioLabs
Restriktionsenzyme <i>Fast digest</i>	Fermentas
<i>RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase</i>	Fermentas
<i>RiboLock™ Rnase Inhibitor</i>	Fermentas
T4-DNA-Ligase	Fermentas
<i>TRIsure</i>	Bioline

2.1.7 Sonstige Materialien

Tabelle 7: sonstige Materialien

Name	Hersteller
Autoradiographiefilm	Amersham Biosciences, Freiburg
Entwicklerkit	Immobilon™ Western Millipore, Eschborn
Glasperlen (Ø 0,1 mm)	Roth, Karlsruhe
Kryoröhrchen 2 ml	Roth, Karlsruhe
Nitrozellulose-Membranen	Whatman, Schleicher & Schüll, Dassel
Zentrifugenröhrchen:	
Ultra Clear (25 x 89 mm)	Beckmann Coulter

2.2 Methoden

2.2.1 Anzucht von *Arabidopsis thaliana* und Sterilisation der Samen

Die *Arabidopsis* Pflanzen wurden je nach Versuchsansatz auf Erde, Estell und Somerville (ES) Flüssig- oder Festmedium oder in Hydrokultur nach W. Schmidt (siehe Tabelle 5) angezogen. Die Kultivierung erfolgte im Gewächshaus auf Erde oder unter kontrollierten Bedingungen in der Klimakammer unter Kurztagbedingungen (22 °C, 80 % Luftfeuchte, 10 h hell (180-200 μ E) und 14 h dunkel). Die Samen wurden in 1,5 %iger Natrium-Hypochloridlösung (v/v und einem Tropfen Tween 20) für 15 min sterilisiert und anschließend viermal mit sterilem Wasser gewaschen.

2.2.2 Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana* (Floral Dip) nach (Chang et al. 1994)

Für die Transformation von *Arabidopsis* Pflanzen wurden *Agrobakterien tumefaciens*, die mit dem gewünschten Plasmid transformiert waren, als Überträger benutzt. Der verwendete Agrobakterienstamm (EAH105) + Plasmid wurde in Flüssigmedium (YEB + entsprechende Antibiotika) bis zu einer optischen Dichte $OD_{600} = 0,8-1,0$ kultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet (5 min, 6000 g, RT) und in Transformationsmedium resuspendiert. Junge Blüten von *Arabidopsis* Pflanzen wurden mit der Zellsuspension mehrmals im Abstand von 4-7 Tagen betropft. Die Selektion der T1-Generation erfolgte durch Keimung auf Selektionsmedium (ES-fest + entsprechende Antibiotika) oder durch Behandlung der Keimlinge mit dem Herbizid Basta®.

Transformationsmedium: 2,2 g/l Muroshige & Skoog-Medium
5 % Saccharose
0,05 % Silwett L-77

2.2.3 Isolation von DNA aus *Arabidopsis thaliana* (Rogers & Bendich, 1985)

Für die DNA-Isolation wurden ca. 100 mg Pflanzengewebe in 700 μ l Extraktionspuffer homogenisiert und anschließend zentrifugiert (1 min, 14 000 g, RT). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf Gefäß überführt und mit einem Volumen Isopropanol (4°C) gemischt. Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert (15 min, 14 000 g, 4 °C) und das Pellet zweimal in 70 % unvergälltem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und in 30 μ l H₂O aufgenommen. Lagerung bei -20 °C.

Extraktionspuffer: 200 mM Tris-HCl, pH 8,0
 250 mM NaCl
 25 mM EDTA
 0,5 % SDS

2.2.4 Isolation von RNA aus *Arabidopsis thaliana*

(mit Trisure von Bioline)

- Blattprobe in flüssigem N₂ homogenisieren
- Gemörserte Probe ohne Auftauen in 800 – 1000 µl Trisure aufnehmen, Vortexen
- Inkubation 5 min, RT
- 160-200 µl Chloroform dazugeben und 15 s kräftig schütteln
- Inkubation 5 min, RT
- Zentrifugation 5 min, 12000 g, RT
- Obere wässrige Phase (ca. 500 µl) in ein neues Eppi überführen
- Präzipitation: ca. 500 µl Isopropanol (1:1) dazugeben, vortexen,
- Inkubation für 10–15 min bei 4 °C (oder ü.N. bei – 20 °C)
- Zentrifugation 20 min, 12000 g, 4 °C
- erhaltenes Pellet 2 x Waschen mit 1 ml 75 % unvergälltem Ethanol
- Pellet trocknen und in Wasser aufnehmen (35–50 µl)
- Bei – 80 °C lagern

2.2.5 cDNA Synthese und DNase-Reaktion

Um zu gewährleisten, dass keine genomische DNA in den RNA-Proben enthalten ist, wird vor der cDNA Synthese eine DNase-Reaktion mit dem *DNase I, RNase-free*-Kit von Fermentas nach Angaben des Herstellers, durchgeführt. Anschließend wurde mit Hilfe einer reversen Transkriptase (*RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase*-Kit von Fermentas) und eines Oligo-dT-Primers von der mRNA die cDNA, nach Angaben des Herstellers, synthetisiert.

2.2.6 Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Hefezellen wurden je nach Stamm und Versuchsansatz in YPD oder SD-ura Fest- oder Flüssigmedium (siehe Tabelle 5) für 2-4 Tage bei 28 °C im Inkubationsschrank angezogen.

2.2.7 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* Zellen, verändert nach (Chen et al. 1992)

Pro Transformationsansatz werden 100 µl Trafo-Mix, 3 µl (10 mg/ml) denaturierter Lachs/Hering-Sperma DNA und 1 µg Plasmid-DNA gemischt.

Darin wird eine große Hefekolonie suspendiert und der Ansatz inkubiert (30 min, 37 °C, 250 rpm). Anschließend wird der Ansatz zentrifugiert (5 min, RT, 3000 g), das Pellet in 100 µl

H₂O aufgenommen und auf Selektionsmedium ausgestrichen und bei 30 °C für 2-3 Tage inkubiert.

Trafo-Mix: 800 µl 50 % (w/v) PEG-3350
 200 µl 2 M Lithiumacetat, sterilfiltriert
 7,7 µl β-Mercaptoethanol

Die Lachs/Hering-Sperma-DNA wurde vor Zusatz zum Trafo-Mix 5 min gekocht und anschließend gut gemischt.

2.2.8 Isolation von Sphäroplasten aus *Saccharomyces cerevisiae* Zellen

Die Hefezellen wurden in 400 ml Kulturen (SD-Medium – Uracil) bis zu einer OD₆₀₀ = 0,8–1 angezogen und anschließend geerntet (3000 g, 5 min, RT). Das Pellet wurde in 50 ml/l Waschpuffer resuspendiert und für 10 min bei 30 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen pelletiert (3000 g, 5 min, RT) und in 15 ml/l Sphäroplastenpuffer ohne Lyticase gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 5 ml Sphäroplastenpuffer + Lyticase aufgenommen und für 30 min – 2 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Sphäroplasten geerntet (1000 g, 2 min, 4 °C).

Waschpuffer: 100 mM Tris-HCl, pH 9,4
 10 mM DTT

Sphäroplastenpuffer: 1,2 M Sorbitol
 20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5 (Mix aus 1 M K₂HPO₄ + 1 M KH₂PO₄)
 + 200 µg /ml Lyticase (Sigma Aldriche)

2.2.9 Isolation von Vakuolen aus *Saccharomyces cerevisiae* Zellen nach King James, (Margolis, 2006)

Die Hefezellen wurden in 400 ml Kulturen (SD-Medium – Uracil + 1 mM FeSO₄) bis zu einer OD₆₀₀ = 0,3–0,5 angezogen und anschließend geerntet (3000 g, 5 min, RT). Das Pellet wurde in 50 ml/l Waschpuffer (siehe 2.2.8) resuspendiert und für 10 min bei 30 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen pelletiert (3000 g, 5 min, RT) und in 15 ml/l Sphäroplastenpuffer (siehe 2.2.8) resuspendiert und anschließend für 30 min bei 30 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut zentrifugiert (1000 g, 4 min, 4 °C), der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet in 10 ml 15 % Ficoll-Lösung + 50 µg/ml Dextran vorsichtig resuspendiert. Nachdem die Zellsuspension für 2 min bei 4 °C und anschließend für 3 min bei 30 °C inkubiert wurde, wurde sie in ein Zentrifugenröhrchen überführt und mit drei unterschiedlichen Ficoll-Lösungen (8 %, 4 % und 0 %) überschichtet. Die Vakuolen wurden

durch Zentrifugation (28 000 rpm, Beckmann Rotor SW28, 4 h, 4 °C im Vakuum) in dem Ficoll-Gradienten isoliert (Ficollgradientenschichten: 10 ml 10 % Ficoll- Zellsuspension + 10 ml 8 %, 4 % und 0 % Ficoll-Lösung). Die Vakuolen sammeln sich an der Grenze zwischen 4 und 0 % Ficoll.

0 % Ficoll: 20 mM Pipes KOH, pH 6,8
200 mM Sorbitol

15 % Ficoll: 10 mM Pipes KOH, pH 6,8
200 mM Sorbitol

4 und 8 % Ficoll werden aus der 0 und 15 % Ficoll-Lösung hergestellt.

2.2.10 Anzucht von *Escherichia coli*

Die Anzucht von *Escherichia coli* (*E. coli*) Zellen erfolgte in LB- Flüssig- oder Festmedium, mit oder ohne entsprechendem Antibiotika bei 37 °C und 250 rpm im Inkubationsschrank.

2.2.11 Herstellung von chemisch kompetenten *Escherichia coli* Zellen (Mandel & Higa, 1992)

Es wurden je 51 ml Medium (50 ml SOB + 1 ml 50 x SOC) mit 0,5 ml einer entsprechenden ü.N.-Kultur von *E. coli* (Dh5α) Zellen angeimpft. Die Kulturen wurden für ca. 2 h bei 37 °C auf dem Schüttler (250 rpm) inkubiert, bis sie eine OD₆₀₀ = 0,3-0,5 (Nullwert = SOB-Medium) erreicht hatten. Anschließend wurden die Kulturen für 10 min auf Eis inkubiert und danach zentrifugiert (5 min, 4 °C, 3000 g). Die Zellpellets wurden in je 16 ml TBI aufgenommen und für 15 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Suspensionen zentrifugiert (5 min, 4 °C, 3000 g), die Zellpellets in je 2 ml TBII aufgenommen und alle Ansätze zusammengegeben. Die Suspension wurde zu 200 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei –80 °C gelagert.

SOB-Medium: 2 % (w/v) Bactotrypton
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
8,6 mM NaCl
2,5 mM KCl

50 x SOC-Medium: 1 M Glucose
0,5 M MgSO₄
0,5 M MgCl₂

TBI: 100 mM RbCl
50 mM MnCl₂ * 4 H₂O
10 mM CaCl₂ * 2 H₂O
30 mM Kaliumacetat (pH 5,8)

TBII: 10 mM RbCl
75 mM CaCl₂ * 2 H₂O
15 % (w/v) Glycerin
10 mM MOPS (pH 6,8)

2.2.12 Transformation von chemisch kompetenten *Escherichia coli* Zellen (Hanahan, 1983)

Die Methode nach Hanahan ermöglicht die Aufnahme von Plasmid-DNA in chemisch kompetente *E. coli* Zellen. Dafür wurden die Zellen für 30 min auf Eis aufgetaut, anschließend mit 10-20 µl Ligationsansatz oder 50-100 ng Plasmid-DNA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der Hitzeschock für 2 min bei 42 °C, gefolgt von 5 min Inkubation auf Eis. Dann wurden zu 200 µl Zellsuspension, 800 µl LB-Medium ohne Antibiotikum gegeben und die Zellen für 60 min bei 37 °C auf dem Schüttler (250 rpm) inkubiert, um die Antibiotikaresistenzkassette zu aktivieren. Je nach Ansatz wurde ein Teil oder der gesamte Transformationsansatz (gesamter Ansatz bei Ligationen- und ca. 1/10 Ansatz bei Plasmidtransformation) auf einer LB-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und diese bei 37 °C ü.N. inkubiert.

2.2.13 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* (Minipräparation)

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach dem Prinzip der „alkalischen Lyse“ (Birnboim & Doly, 1979).

Für die Isolation wurden 2 ml einer ÜN-Kultur (*E. coli* mit entsprechendem Plasmid) zentrifugiert (5 min, 5000 g, RT), der Überstand verworfen und das erhaltene Pellet in 300 µl P1-Puffer aufgenommen und gevortext. Zu dem Ansatz wurden 300 µl P2-Puffer gegeben, der Ansatz vorsichtig geschwenkt und anschließend erfolgte die Zugabe von 300 µl P3-Puffer. Der Ansatz wurde gut gemischt, für 10 min bei RT inkubiert und zentrifugiert (10 min, 14000 g, RT). Der Überstand wurde abgenommen und mit 0,7 Vol Isopropanol und 0,1 Vol Natriumacetat (3 M, pH 5,2) versetzt. Nach 5 min Inkubation auf Eis, wurde der Ansatz zentrifugiert (30 min, 14000 g, 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet mit 900 µl 70 %igem unvergälltem Ethanol gewaschen. Anschließend erfolgte erneut eine Zentrifugation (10 min, 14000 g, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei 30 °C getrocknet, bis das Ethanol verdunstet war. Das Pellet wurde in 40 µl sterilem Wasser aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

P1-Puffer (Resuspensionspuffer): 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
10 mM EDTA, pH 8,0
autoklavieren (20 min, 121 °C)
100 µg/ml RNase A
Lagerung bei 4 °C nach Zugabe der RNase A

P2-Puffer (Lysispuffer): 200 mM NaOH
 1 % (w/v) SDS
 autoklavieren (20 min, 121 °C)

P3-Puffer (Neutralisationspuffer): 3 M Kaliumacetat, pH 5,5 (Einstellen mit Essigsäure)
 autoklavieren (20 min, 121 °C)

2.2.14 Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens*

Die Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens* erfolgt in YEB- Flüssig- oder Festmedium mit oder ohne entsprechendem Antibiotika für 2-4 Tage bei 30 °C und 250 rpm im Inkubationsschrank.

2.2.15 Herstellung von chemisch kompetenten *Agrobacterium tumefaciens* Zellen

Drei Milliliter einer Übernachtskultur wurden in 200 ml YEB-Medium aufgenommen und inkubiert (3-4 h, 250 rpm, 30 °C) bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5–0,8. Die Zellen wurden geerntet (20 min, 5000 g, RT) und das Pellet in 10 ml TE-Puffer (4 °C) gewaschen. Nach anschließender Zentrifugation (10 min, 5000 g, 4 °C) wurde das Pellet in 20 ml YEB-Medium resuspendiert, zu je 500 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
 1 mM EDTA

2.2.16 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* Zellen nach (Nishiguchi et al. 1987)

Die Methode nach Nishiguchi erfolgt nach dem Einfrier-Auftau-Prinzip. Die kompetenten Zellen wurden langsam bei 4 °C aufgetaut. Nach Zugabe von 0,5–1 µg Plasmid, wurde der Ansatz für 5 min bei 4 °C, dann für 5 min in flüssigem Stickstoff und anschließend für 10 min bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 1 ml YEB-Medium und eine Inkubation (2-4 h, 28 °C, 250 rpm). Abschließend wurden die Zellen geerntet (5 min, 6000 g, RT), das Pellet in 100 µl YEB-Medium aufgenommen und auf YEB-Platten + Antibiotikum ausplattiert und zwei – drei Tage bei 28 °C inkubiert.

2.2.17 Herstellung von Dauerkulturen

Zur Herstellung von *E. coli*- , Agrobakterien- bzw. Hefedauerkulturen wurden je 2 ml der entsprechenden Kulturen zentrifugiert (4 min, 4000 g, RT) und das Pellet in einem Milliliter des entsprechenden Mediums, ohne Antibiotikum, resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,5 ml sterilem 80 %igem Glycerin, Überführung der Suspension in ein

Kryoröhrchen und Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff. Die Lagerung der Kulturen erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.18 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Methode von (Sanger et al. 1977) und wurde von der Firma DLMBC im Institut für Biologie der Humboldt Universität zu Berlin durchgeführt.

2.2.19 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) dient der exponentiellen Vervielfältigung eines spezifischen DNA Fragments, welches nur in einer oder wenigen Kopien vorliegt. Der gewünschte Abschnitt wird durch die Verwendung von einem Anfangs- und Endprimer, die sich über komplementäre Basenpaarung an die DNA anlagern, definiert. Die Primer stellen das freie 3'OH Ende, welches die DNA-Polymerase benötigt, um fehlende Nukleotide aufzufüllen, bereit. Die PCR erfolgte mit der *MangoTaq* von Bioline oder der *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* von BioLabs nach Angaben des Herstellers. Die Reaktion erfolgt in einem Thermocycler (PCR-Maschine).

2.2.20 Real-time quantitative PCR (qRT-PCR)

Mit Hilfe der qRT-PCR ist es möglich die exakte Menge der ursprünglich vorhandenen DNA zu bestimmen und so eine genaue Aussage über die Transkriptabundanz der untersuchten Gene zu machen. Für die Reaktion wurde die RNA, wie unter 2.2.4 beschrieben isoliert. Anschließend erfolgte eine DNase Reaktion und cDNA Synthese (2.2.5). Die cDNA wurde in einem 10 μl Reaktionsansatz mit SensiMix SYBR No-ROX Kit (Bioline) verwendet und die Reaktion in dem Thermocycler CFX96 Realtime-system (BioRAD) durchgeführt. Als Kontrolle wurde das Haushaltgen *Actin2* mitgeführt. Alle Proben wurden in Triplikaten analysiert und die Daten mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ Methode nach Livak und Schmittgen (Livak & Schmittgen, 2001) ausgewertet.

2.2.21 DNA und RNA Agarose-Gelelektrophorese nach (Adkins & Burmeister, 1996)

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA- und RNA-Fragmenten abhängig von ihrer Größe im elektrischen Feld. Hierfür wurde die DNA/RNA mit 10 x DNA-Ladepuffer versetzt und in einem 0,8-1%-igen Agarosegel (Agarose gelöst in 0,5 x TBE-Puffer) bei 80-100 mV über einen Zeitraum von 30-60 min aufgetrennt. Für die Detektion wurde dem gelösten Gel Ethidiumbromid in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt. Parallel zu den DNA-Proben wurde immer ein entsprechender Größenstandard mitgeführt. Die Dokumentation der Gel-Bilder erfolgte mit Hilfe des Intas UV-Systems.

10 x DNA-Ladepuffer:	60 %	Glycerin
	20 mM	EDTA, pH 8,0
	0,3 %	Bromphenolblau
	0,3 %	Xylencyanol
0,5 x TBE-Puffer:	5,4 g/l	Tris
	2,75 g/l	Borsäure
	1 mM	Na ₂ EDTA

2.2.22 DNA-Extraktion aus einem Agarosegel

Mit Hilfe der Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen können diese für weitere Arbeitsschritte gewonnen werden. Dafür wurde zuerst die entsprechende DNA-Bande mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und die Masse gewogen. Die Extraktion wurde mit dem *Isolate PCR and Gel*-Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.23 Spaltung von DNA mittels Restriktionsenzymen (Restriktion)

Das Ziel der Restriktion ist das spezifische Schneiden von DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen. Der Restriktionsansatz erfolgte hierbei entsprechend der Herstellerangaben.

2.2.24 5'-Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren

Dephosphorylierung von 5'-Enden erfolgt bei, mit nur einem Enzym geschnittenen linearisierten Vektoren, um eine Religation zu verhindern und die Ligation zwischen Vektor und DNA-Fragment zu begünstigen. Die Entfernung der Phosphatgruppen am 5'-Ende erfolgte mit alkalischer Phosphatase (CIAP = *calf intestine alkaline phosphatase*), nach dem Protokoll des Herstellers.

2.2.25 Ligation von DNA-Molekülen

Die Ligation von geschnittenem Vektor und DNA-Fragment erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase von Fermentas nach Angaben des Herstellers bei 4 °C über Nacht oder für 2 h bei RT. Das Mengenverhältnis von Vektor und DNA-Fragment errechnet sich nach folgender Formel.

$$\text{Masse}_{\text{Fragment}} [\text{ng}] = \frac{125 \text{ ng} * \text{Länge}_{\text{Fragm.}} [\text{bp}]}{\text{Länge}_{\text{Vektor}} [\text{bp}]}$$

2.2.26 Dot-Blot-Analyse

Die Dot-Blot-Analyse dient, ähnlich der Western-Blot-Analyse, der Identifizierung markierter Proteine in einem Proteingemisch. Bei der Dot-Blot-Analyse wurden die Proteinlösungen mittels Dot-Blot Apparatur auf eine in Blot-Puffer äquilibrierte Nitrozellulosemembran übertragen. Im Gegensatz zum Western-Blot wurden die Proteine vorher nicht elektrophoretisch in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Es befinden sich somit alle

Proteine auf einer Stelle auf der Membran. Anschließend wurde die Membran erst für 1 h in Blocklösung und dann für 1 h in der Antikörperlösung inkubiert. Nach drei maligem Waschen mit TBST wurde die Membran für zwei Minuten mit Entwicklerkit (ImmobilonTM Western Millipore, Eschborn) inkubiert. Danach können die antikörpermarkierten Proteine durch Auflegen eines Röntgenfilms sichtbar gemacht werden.

Blocklösung: TBST + 4 % (w/v) Milchpulver

Antikörperlösung: Blocklösung + *antiHis*-Antikörper (1:10000)

TBST: 100 mM Tris-HCl, pH 7,5
 150 mM NaCl
 0,1 % Tween

2.2.27 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde nach Bradford (Bradford, 1976) durchgeführt. Zu Beginn wurde eine BSA-Eichkurve erstellt. Dazu wurden definierte BSA Mengen in 800 µl A. bidest gelöst, mit 200 µl Bradford-Reagenz gemischt und nach 5 min Inkubation bei RT im Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm die Extinktion vermessen. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden dann 20-40 µl der Proteinlösung mit A. bidest auf 800 µl aufgefüllt und nach Zugabe von 200 µl Bradford-Reagenz und 5 min Inkubation bei RT die Probe bei 595 nm vermessen. Die Proteinkonzentration in µg/µl wurde anschließend an Hand der BSA-Eichkurve berechnet.

1 l Bradford-Reagenz: 100 mg Serva-Blau
 50 ml 95 % Ethanol (unvergällt)
 100 ml 85 % (v/v) Phosphorsäure
 Ad H₂O

2.2.28 Messung der Eisenkonzentration nach Wolfgang Schmidt, 1996

Für die Messung der Eisenkonzentration wurden definierte Mengen (Volumina, Gewichte usw.) der entsprechenden Proben in 2 ml Eppendorf®-Gefäße überführt. Je nach Probe wurden diese für eine Nacht bei 65 °C getrocknet oder in 75 µl Salpetersäure inkubiert. Die getrockneten Proben wurden auch mit 75 µl Salpetersäure versetzt und anschließend erfolgte der Eisenaufschluss bei 95 °C im Thermoblock für 30 min – 6 h. Nach der Zugabe von 50 µl Wasserstoffperoxid, weiteren zwei Stunden Inkubation bei 56 °C, wurden die Proben mit sterilem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 200 µl angeglichen. Als Nachweisreagenz diente BPDS-Puffer, von dem 980 µl mit 20 µl der Probe gemischt und für 5 min bei RT inkubiert wurden. Hierbei bildet das in der Probe enthaltene Eisen einen Fe²⁺-BPDS-Komplex der

photometrisch bei einer Wellenlänge von 535 nm vermessen werden kann (Schmidt, 1996). Die Bestimmung des Eisengehaltes erfolgte anhand einer Eichgrade.

BPDS-Puffer: 0,48 M Hydroxylamin Hydrochlorid
 0,6 M Natriumacetat
 1 mM BPDS

2.2.29 Färbung von Eisen in Embryonen nach Perls (Perl & Good, 1992)

Vor der Isolation der Embryonen wurden die Samen für 24 h in sterilem Wasser bei RT inkubiert. Die Embryonen wurden mit Hilfe eines Binokulars und kleinen Kanülen isoliert und für die Färbung für 15 min im Vakuum in der Perls Lösung infiltriert. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation in Perls Lösung für 1-24 h bei RT. Die gefärbten Embryonen wurden dreimal in sterilem Wasser gewaschen und anschließend optisch ausgewertet.

Perls Lösung: 4 % (v/v) HCl
 4 % K-Ferrocyanid ($C_6N_6FeK_4$)

2.2.30 Klonierung der *VTL*-Promotor-GUS Fusionskonstrukte

Für die *VTL*-Promotor-GUS Fusionskonstrukte wurden die potentiellen Promotorsequenzen (ca. 1 kb) aus der genomischen DNA von *Arabidopsis thaliana* (Col-0) amplifiziert (*VTL1* Primer: #*VTL1*prom-fw und #*VTL1*prom-rev; Fragment: -937 bis + 10, *VTL5* Primer: #*VTL5*prom-fw und #*VTL5*prom-rev; Fragment: - 857 bis + 14). Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden über die Schnittstellen *Pst*I und *Nco*I in den pCAMBIA 1391-z kloniert und so mit GUS fusioniert. Der fertige Vektor wurde in den Agrobakterienstamm EAH105 transformiert und anschließend wurden *Arabidopsis* (Col-0) Pflanzen mit Hilfe der *Floral Dip* Methode stabil transformiert. Die geernteten Samen (T1) wurden auf Selektionsmedium (MS + 50 µg/ml Kanamycin) ausgebracht und die positiven Transformanten auf Erde überführt und zur Samenreife gebracht. Die so erhaltenen Samen (T2) dienten als Ausgangsmaterial für die hier durchgeführten Versuche.

2.2.31 Histochemischer und Fluorometrischer GUS-Assay

Der histochemische GUS-Assay wird benutzt um die Aktivität des Reporters β -Glucuronidase (GUS) direkt sichtbar zu machen und ermöglicht so eine gewebespezifische Lokalisation. Dafür wurde das zu untersuchende Pflanzenmaterial geerntet und bei 37 °C für 30 min – 24 h in GUS-Puffer inkubiert. Die entstehende Blaufärbung wurde optisch dokumentiert.

GUS-Puffer: 80 mM Na₂PO₄ * 2H₂O, pH 7,2
 0,4 mM K₃FeCN₆
 0,4 mM K₄FeCN₆ * 3 H₂O
 8 mM EDTA
 0,05 % Triton X 100
 0,8 mg/ml X-Glc (frisch dazugeben)

Der fluorometrische GUS-Assay ermöglicht eine Quantifizierung der Aktivität der β -Glucuronidase. So kann die Abhängigkeit der Aktivität des Promotors von Faktoren wie Stress, Hormonen, Ernährung, Licht usw. untersucht werden. Ca. 100 mg frisches Pflanzengewebe wurde in Extraktionspuffer homogenisiert. Anschließend wurde die Suspension für 5 min zentrifugiert (4 °C, 14 000g), der Überstand ist der aktive Extrakt. Für eine Messung wurden 50 μ l Extrakt mit 0,5 ml *Assay*-Puffer (37 °C warm) gemischt und bei 37 °C für 30 min – 24 h inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde eine Probe genommen (100 μ l) und diese mit 0,9 ml Stopp-Puffer gemischt. Die Messung erfolgte bei 360 nm.

Extraktionspuffer: 50 mM NaPO₄, pH 7,0
 10 mM DTT
 1 mM Na₂EDTA
 0,1 % Natrium Lauryl Sarcosine
 0,1 % Triton X 100

Assay-Puffer: 1 mM MUG in Extraktionspuffer

Stopp-Puffer: 0,2 M Na₂CO₃

2.2.32 Klonierung der VTL-mCherry Konstrukte und mikroskopische Auswertung der Lokalisation mittels Konfokalmikroskop

Der ursprüngliche Versuch sah es vor, von allen *VTL* Genen sowohl N- wie auch C-terminale Fusionsproteine mit mCherry zu konstruieren und diese stabil in *Arabidopsis* Pflanzen bzw. transient in Tabakblätter zu transformieren und anschließend die Lokalisation mittels konfokaler Mikroskopie zu analysieren. Dafür wurden die *VTL* kodierenden Sequenzen zuerst amplifiziert und über EcoRI und SmaI bzw. SmaI und BamHI in den pSAT6-mCherry-C1-B bzw. den pSAT4-mCherry-N1 Vektor kloniert, um sie mit mCherry zu fusionieren. Anschließend wurde das Fusionskonstrukt ausgeschnitten und über Pi-PspI oder ScaI in den binären Expressionsvektor pPZP-RCS2-osc-bar-Sma ligiert. Der fertige Vektor wurde je nach Transformationsansatz in den Agrobakterienstamm EAH105 oder GV2260 transformiert, welche dann für die Transformation der Pflanzen eingesetzt wurden. Die erfolgreiche Klonierung wurde mittels Kolonie-PCR und Sequenzierung überprüft. Die stabil

transformierten *Arabidopsis* Pflanzen wurden mittels dem Herbizid, BASTA selektiert. Das transient transformierte Blattmaterial wurde nach zwei Tagen Inkubation ausgewertet. Zur Detektion der Signale erfolgte eine Anregung mit einem Helium-Neon-Laser bei 543 nm für mCherry, bei 514 nm für YFP und mit einem Argon-Laser bei 488 nm für Chlorophyll. Die Detektion erfolgte für mCherry zwischen 590 und 650 nm, für YFP zwischen 520 und 535 nm und für Chlorophyll zwischen 660 und 760 nm. Zur besseren Differenzierung der Membranen wurden die Zellen teilweise durch 20 min Inkubation in 60 %iger Saccharoselösung plasmolysiert.

3. Ergebnisse

3.1 Phylogenetische Einordnung und Untersuchung der eisenabhängigen Expression der *VTL* Gene

Wie unter 1.2 beschrieben stand am Anfang dieser Arbeit die Entdeckung von drei unbekannten Genen, die eine schnelle Eisenmangelantwort zeigen. Ihre Expression in *Arabidopsis thaliana* Wurzeln nimmt in den ersten 1-24 h deutlich ab (Yang et al. 2010; Buckhout et al. 2009). Um einen ersten Hinweis auf eine mögliche Funktion dieser Gene zu bekommen, wurden weitere verwandte Gene basierend auf der Aminosäuresequenz von VTL5 (At3g25190) gesucht. Der erhaltene Stammbaum zeigte, dass die gefundenen Gene zu einer kleinen Gen-Familie mit fünf Mitgliedern gehören, die entfernt (zu 30 % identisch und 55 % sequenzähnlich) mit dem vakuolären Eisenimporter VIT1 verwandt sind (Abb. 5). Bei der phylogenetischen Einordnung der VTL Sequenzen sieht man, dass sich homologe Sequenzen sowohl in mono- und dikotyledonen Pflanzen, wie auch *Chlamydomonas*, *Physcomitrella* und Hefe finden lassen (Abb. 6). Dabei gibt es eine klare Teilung zwischen den mono- und dikotylen Pflanzen. Die VTL *Arabidopsis* Sequenzen sind näher miteinander verwandt, als zu Sequenzen aus anderen Spezies, jedoch insgesamt relativ weit entfernt von VIT1 (Gollhofer et al. 2011). Die beiden hier mit aufgeführten Proteine aus *Chlamydomonas reinhardtii* wurden als CCC1-like Proteine (Cre02.g099500 = cw92 mt+ 112030) und Cre02.g107550 = cw92 mt+ 377147) identifiziert, die wahrscheinlich Eisen in die Vakuole transportieren (Urzica et al. 2012). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der beiden Proteine mit den VTL-Proteinen, ergab eine Übereinstimmung von 37–38 % (Abb. 7, gezeigt ist VTL5).

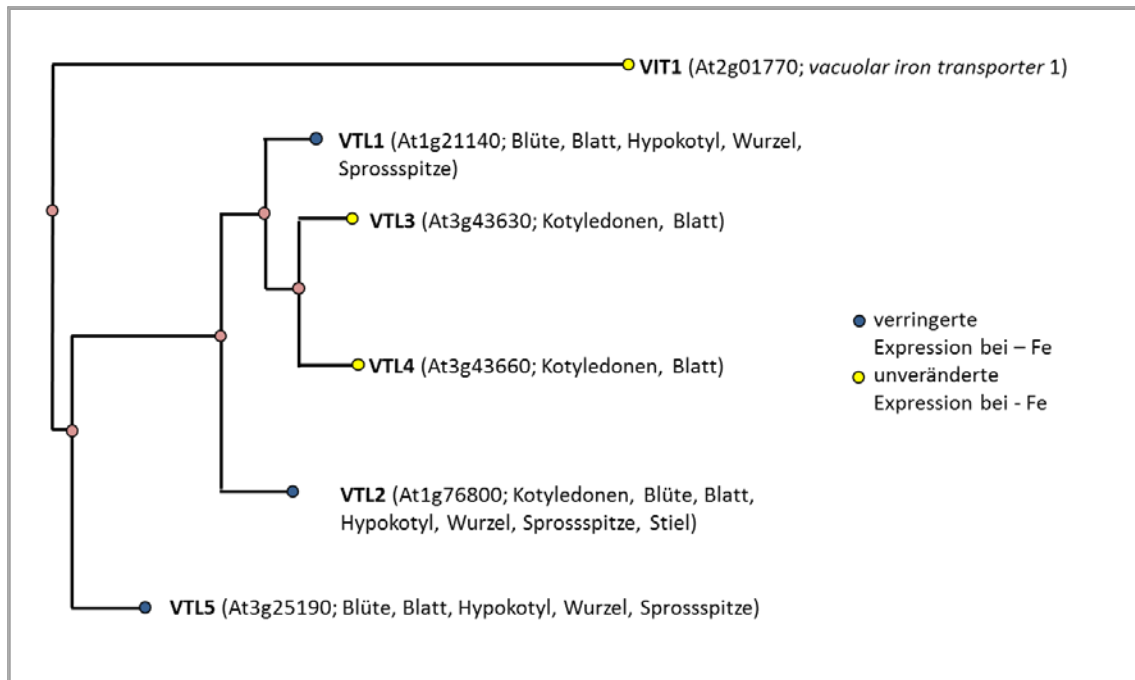


Abbildung 5: Stammbaum-Analyse der VTL-Proteine aus *Arabidopsis thaliana*, basierend auf der Aminosäuresequenz von VTL5 (At3g25190) (www.arabidopsis.org). Der Stammbaum wurde mit der *neighbor-joining* Methode errechnet (www.ncbi.nlm.nih.gov), (Programm: BLASTP 2.2.30+).

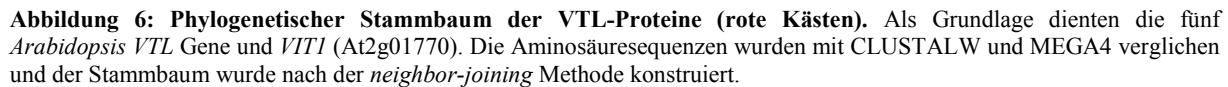


Abbildung 7: Aminosäuresequenzvergleich von *Arabidopsis* VTL5 und den beiden CCC1-like Proteinen aus *Chlamydomonas reinhardtii* (www.algaepath.itps). Der Vergleich wurde mit dem Programm: BlastP2.2.30+ errechnet (www.uniprot.org). Dunkelgrau bzw. mit * markierte AS sind in allen drei Proteinen identisch; : markiert Übereinstimmung zwischen VTL5 und einem Protein aus *Chlamydomonas* und . markiert AS Übereinstimmung zwischen den beiden *Chlamydomonas* Proteinen.

Um die vorhandenen Microarraydaten zu bestätigen und einen Gesamtüberblick über die eisenabhängige Expression der fünf *VTL* Gene zu erhalten wurde eine semiquantitative PCR Analyse durchgeführt. Für den Versuch wurde die RNA von fünf Wochen alten Pflanzen isoliert, die verschieden ernährt wurden. Wie bereits im Microarray zu sehen war, ist die Expression von *VTL1*, 2 und 5 eisenabhängig. Unter Eisenmangel ist sie stark reduziert, nimmt jedoch sofort zu, wenn Eisen vorhanden ist. Außerdem sieht man, wie die Microarraydaten vermuten ließen, keine eisenabhängige Expressionsänderung für *VTL4*. Das *VTL4* Gen wird durchgängig exprimiert. Als neue Information konnte jedoch eine eisenabhängige Expression von *VTL3* gezeigt werden. Insgesamt wird *VTL3* eher schwach exprimiert, aber die Expression nimmt mit zunehmender Eisenkonzentration zu (Abb. 8).

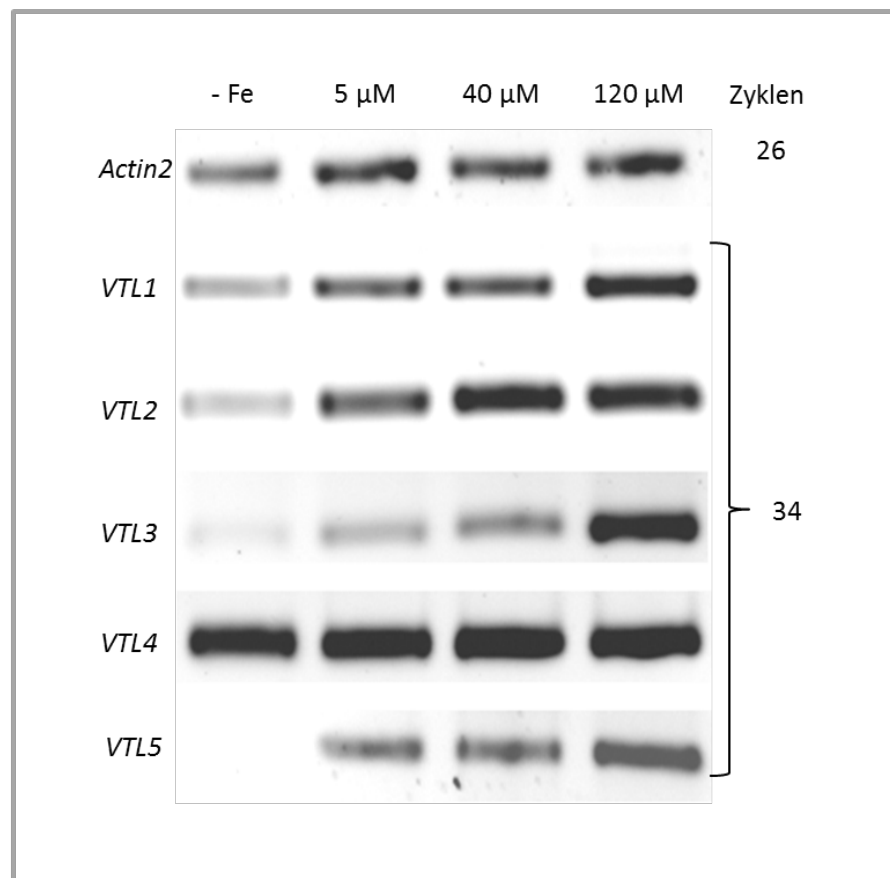


Abbildung 8: Semiquantitative PCR Analyse der Expression der *VTL* Gene in Abhängigkeit von der Eisernährung. Vier Wochen alte, vollernährte Pflanzen wurden für 10 Tage auf Medium mit verschiedenen Eisenkonzentrationen angezogen und dann die RNA der Wurzeln isoliert. Die Analyse zeigt eine eisenabhängige Expression für *VTL1*, 2, 3 und 5.

3.2 Sequenzvergleich und Analyse der putativen Proteinstruktur der *VTL*-Proteine

Vergleicht man die Aminosäuresequenzen der *VTL*-Proteine untereinander, sind sie zwischen 61 und 88 % identisch zueinander und 30 % identisch zu VIT1 (Abb. 9a). Eine Analyse der Sequenzen zeigt, dass alle *VTL*-Proteine eine CCC1-like Domäne enthalten (Abb. 9c, gezeigt

ist VTL1). Diese Domäne ist aus dem in Hefe vorkommenden Carrier CCC1p bekannt, welcher Eisen und Mangan in die Vakuole transportiert (Li et al. 2001) und lässt sich auch in anderen verwandten Proteinen finden. Die Berechnung der hypothetischen Sekundärstruktur der VTL-Proteine zeigt fünf potentielle Transmembrandomänen mit einem zytosolischen N-Terminus, einem extrazytoplasmatischen C-Terminus und einer zytoplasmatischen Schleife zwischen der zweiten und dritten Transmembrandomäne. Wobei die Wahrscheinlichkeit für die erste Domäne niedriger ist, als für die anderen vier (Aramemnon.botanik.uni-koeln.de) (gezeigt ist VTL1 Abb. 9b). Die Berechnung der Struktur von VIT1 zeigt ein ähnliches Ergebnis, wie das für die VTL-Proteine, mit dem Unterschied, dass die zytoplasmatische Schleife größer ist (Daten nicht gezeigt).

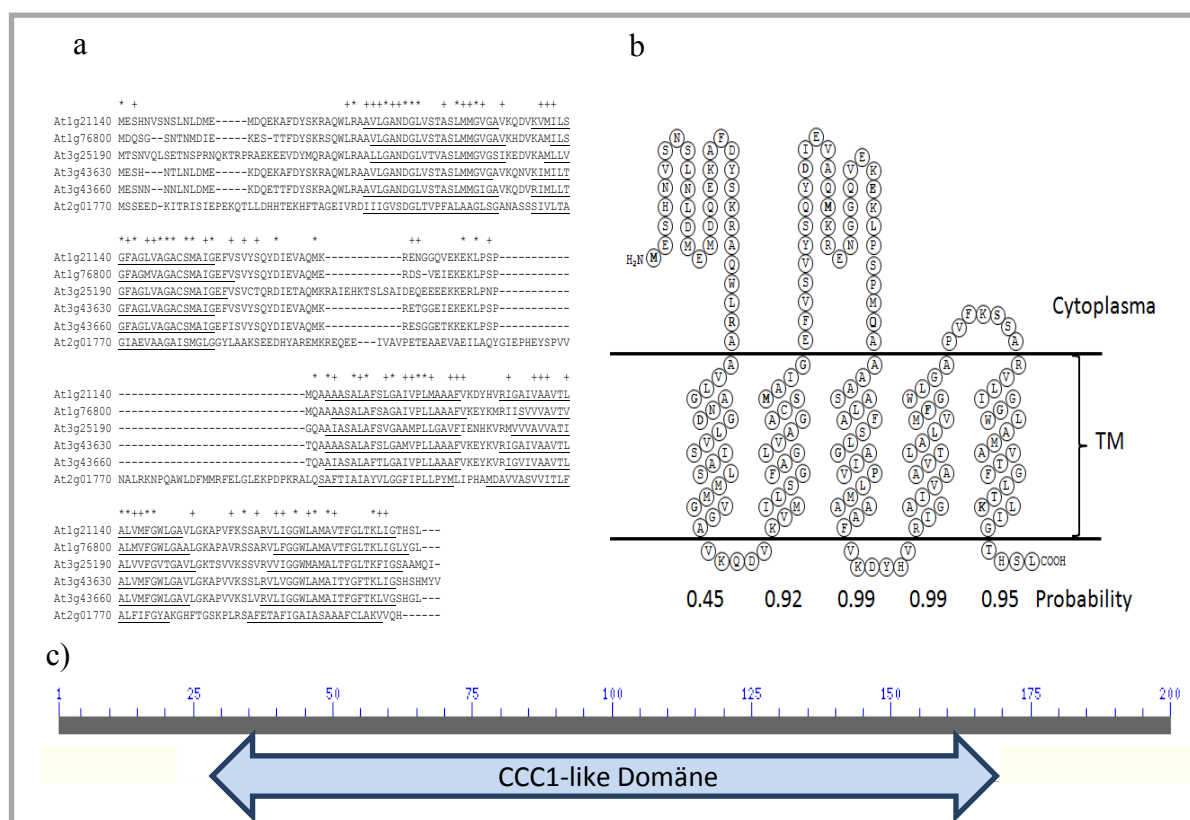


Abbildung 9: Sequenzvergleich und hypothetische Proteinstruktur der VTL-Proteine. a) Vergleich der Aminosäuresequenzen der VTL-Proteine untereinander und mit VIT1 (At2g01770) (ClustalW Algorithmus). * = konservierte Aminosäuren (AS), + = gleiche AS innerhalb der VTL-Proteine, die unterstrichenen Bereiche markieren die Transmembrandomänen (TM). b) Hypothetische Proteinstruktur von VTL1 (At1g21140) (Aramemnon.botanik.uni-koeln.de) mit fünf TM, einem zytoplasmatischen N-Terminus, extrazytoplasmatischen C-Terminus und einer zytoplasmatischen Schleife zwischen der zweiten und dritten TM. Die Wahrscheinlichkeit ist unter jeder Domäne angegeben. c) Ermittlung von konservierten Domänen am Bsp. von VTL1 (CDD aus www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.3 Analyse der *VTL1* und *VTL5* Promotor Aktivität mittels histochemischem und fluorometrischem GUS-Assay

Um die organ- und gewebespezifische Expression der *VTL* Gene zu untersuchen und zu ermitteln, ob es eine ernährungsbedingte Veränderung der Expression gibt, wurden transgene *Arabidopsis* Pflanzen erzeugt. Dafür wurden Pflanzen mit dem Reportergen β -Glucuronidase (GUS) unter der Kontrolle eines *VTL* Promotors (ca. 1 kb) stabil transformiert und anschließend mit den Pflanzen ein histochemischer oder fluorometrischer GUS-Assay durchgeführt (siehe 2.2.30). Im Rahmen dieser Arbeit wurden transgene Pflanzen für den *VTL1* und *VTL5* Promotor erzeugt (siehe 2.2.29).

3.3.1 Vergleich der gewebespezifischen Expression von *VTL1* und *VTL5* in transgenen *Arabidopsis* Keimlingen

Zur Analyse der Lokalisation und Funktion der einzelnen *VTL* Gene wurde die Promotoraktivität mittels GUS-Fusionskonstrukten in verschiedenen Entwicklungsstadien und Organen untersucht. Unter der Kontrolle des *VTL1* Promotors konnte ein GUS-Signal in Samen, Embryonen und Keimlingen nachgewiesen werden. In den Keimlingen verläuft das Signal entlang des Gefäßleitsystems, sowohl im Spross, den Keimblättern, wie auch in der Wurzel. In *VTL5* transgenen Pflanzen konnte kein Signal in den Samenanlagen detektiert werden und nur eine schwache GUS Expression im Embryo. Im Keimling kommt es auch zu einer deutlichen Detektion im Gefäßleitsystem, allerdings vorwiegend in der Stele der Wurzel (Abb. 10a). Bei der Untersuchung der GUS Expression in den Blütenständen von *VTL1* und *VTL5* transgenen Pflanzen, konnte bei *VTL1* ein Signal im Gefäßsystem des Filaments detektiert werden. Bei *VTL5* war neben dem Filament auch eine Expression im Konnektiv und den Pollenkörnern nachweisbar (Abb. 10b).

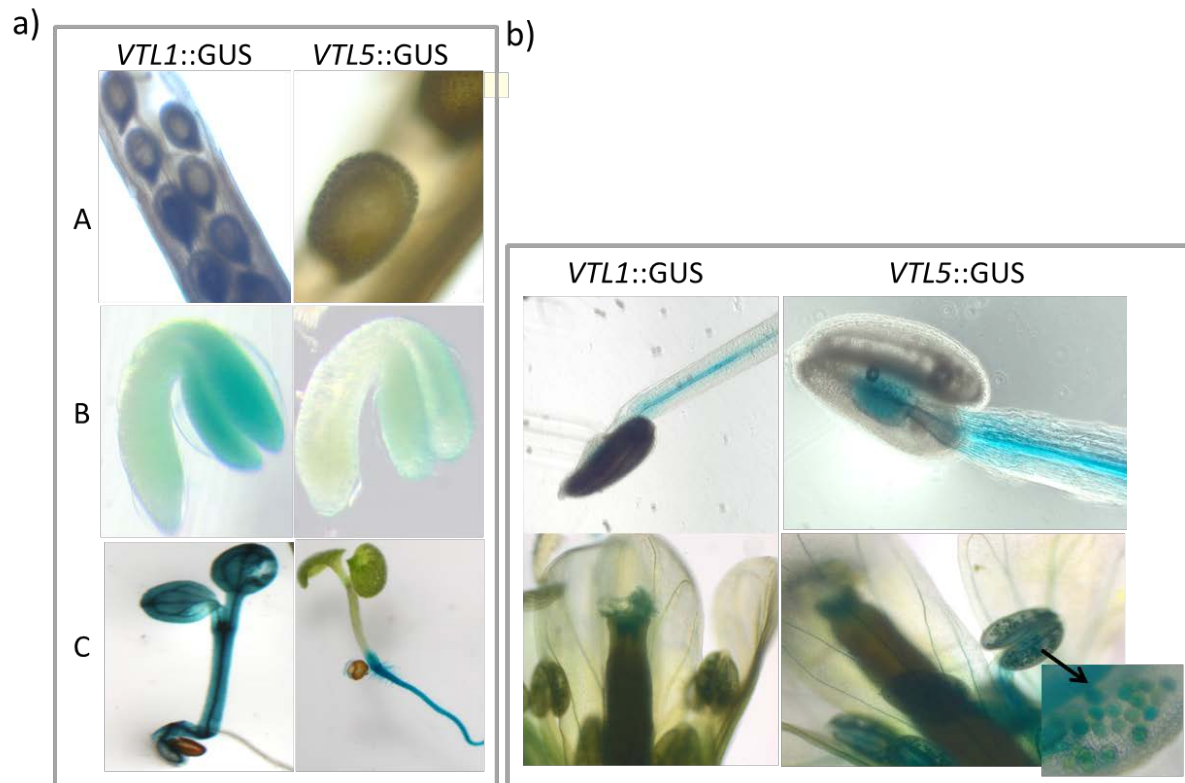


Abbildung 10: Vergleich der gewebespezifischen Expression von *VTL1* und *VTL5*. (a) Detektion von GUS in transgenen *VTL1* und *VTL5* Pflanzen im Samen (A), Embryo (B) und Gefäßleitsystem des gesamten Keimlings (C). Die Expression von GUS in den transgenen *VTL5* Pflanzen ist schwach im Embryo und stark im Gefäßleitsystem in der Stele der Wurzel verglichen mit den *VTL1* Pflanzen. (b) Detektion von GUS in den Blütenständen von transgenen *VTL1* und *VTL5* Pflanzen. *VTL1*: Signal entlang der Gefäße im Filament. *VTL5*: Signal im Filament, dem Konnektiv und den Pollenkörnern. Die potentielle Promotorsequenz (1 kb aufwärts von der *VTL1* bzw. *VTL5* kodierenden Sequenz) wurde mit GUS (β -Glucuronidase) fusioniert und in *Arabidopsis* transformiert. Die Pflanzen wurden auf ES-Vollmedium angezogen.

3.3.2 Untersuchung der ernährungsabhängigen Expression von *VTL1* und *VTL5* in *Arabidopsis* Keimlingen

Um eine ernährungsabhängige Expression zu untersuchen wurden Keimlinge der transgenen *VTL1* und *VTL5* Pflanzen auf ES Medien mit verschiedenen Eisen-, Zink-, und Mangankonzentrationen angezogen und nach 10 Tagen ein histochemischer oder fluorometrischer GUS-*Assay* durchgeführt. Wie man in Abbildung 11 sehen kann gibt es eine deutliche eisenabhängige Expression (-Fe = 0 μ M, + Fe = 40 μ M) der β -Glucuronidase unter der Kontrolle der VTL Promotoren. Unter Eisenmangel nimmt die Expression stark ab. Auch kann eine deutliche Zunahme der Expression unter Eisenüberschuss gezeigt werden (Abb. 12).

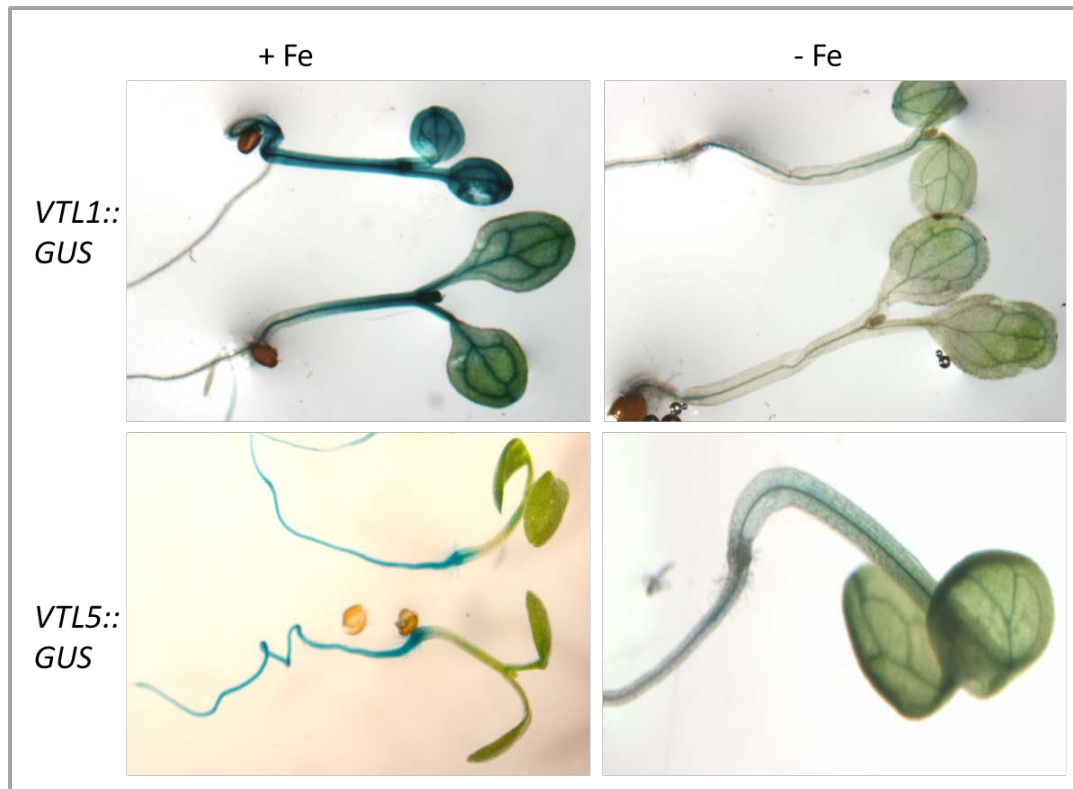


Abbildung 11: Analyse der eisenspezifischen Expression von *VTL1* und 5 in transgenen Keimlingen. Das *VTL1* und 5 Gen aus *Arabidopsis thaliana* ist entlang des Gefäßsystems exprimiert, wobei die Expression mit zunehmender Eisenkonzentration steigt. Die potentielle Promotorsequenz (ca. 1 kb aufwärts von der *VTL1* bzw. *VTL5* kodierenden Sequenz) wurde mit GUS (β -Glucuronidase) fusioniert und in *Arabidopsis* transformiert. Der GUS-Assay erfolgte an 10 Tage alten Keimlingen, die auf ES-Vollmedium (+ Fe) oder Medium ohne Eisen (-Fe) angezogen wurden.

Wenn man die Keimlinge unter Zink- und Manganmangel oder Überschuss anzieht (ES (Normalernährung) = 1 μ M Zn/14 μ M Mn, -Zn/-Mn = 0 μ M, ++Zn = 5 μ M, ++Mn = 28 μ M, ++Fe = 120 μ M) konnte im histochemischen GUS-Assay keine so deutliche Expressionsänderung wie unter Eisenmangel detektiert werden. Es erscheint so, dass es unter der Kontrolle des *VTL5* Promotors zu einer Verringerung der Expression unter Zinkmangel kommt (Abb. 12). Um die Ergebnisse aus dem histochemischen GUS-Assay zu unterstützen wurde ein fluorometrischer GUS-Assay durchgeführt, womit eine quantitative Aussage über die Expression gemacht werden konnte. Wie in Abbildung 13 zu sehen ist, konnten die Ergebnisse zur eisenabhängigen Expression bestätigt werden. Unter der Kontrolle beider Promotoren kommt es zu einer eindeutigen Abnahme der Expression unter Eisenmangel, bzw. zu einer Zunahme unter Eisenüberschuss. Zusätzlich dazu konnte eine signifikante Abnahme der Expression unter Zinkmangel, wenn GUS unter der Kontrolle des *VTL5* Promotors exprimiert wurde, gemessen werden. Im Gegenteil dazu nimmt die Expression unter Manganmangel zu, bzw. unter Überschuss ab, wenn GUS unter der Kontrolle des *VTL1* Promotors exprimiert wird. Auch in den *VTL5* transgenen Pflanzen kommt es zu einer Abnahme der Expression bei verschiedener Manganfütterung, dieser Phänotyp scheint jedoch

nicht spezifisch zu sein. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass beide Proteine Mitspieler in der Eisenhomöostase sind. Vermutet man, dass es sich bei dem *VTL1* und 5 Protein um einen Transporter handelt, so liegt es nahe, dass sie auch andere zweiwertige Metalle wie Zink oder Mangan transportieren können, da dies auch von bekannten Transportern wie z.B. *IRT1*, *CCC1p* und *VIT1* bekannt ist (Kim et al. 2006 b; Li et al. 2001; Rogers et al. 2000; Korshunova et al. 1999).



Abbildung 12: Analyse der ernährungsspezifischen Expression von *VTL1* und 5 in transgenen Keimlingen. Der histochemische GUS-Assay erfolgte an 10 Tage alten Keimlingen die auf ES-Vollmedium (40 μM Fe, 1 μM Zn, 14 μM Mn), Mangelmedium (-Fe, -Zn, -Mn) oder Überschussmedium (++) (++)Zn = 5 μM , ++Mn = 28 μM , ++Fe = 120 μM) angezogen wurden. Unter Eisenmangel ist die Expression von GUS sowohl unter der Kontrolle des *VTL1*, wie auch des *VTL5* Promotors verringert, bzw. unter Überschuss erhöht.

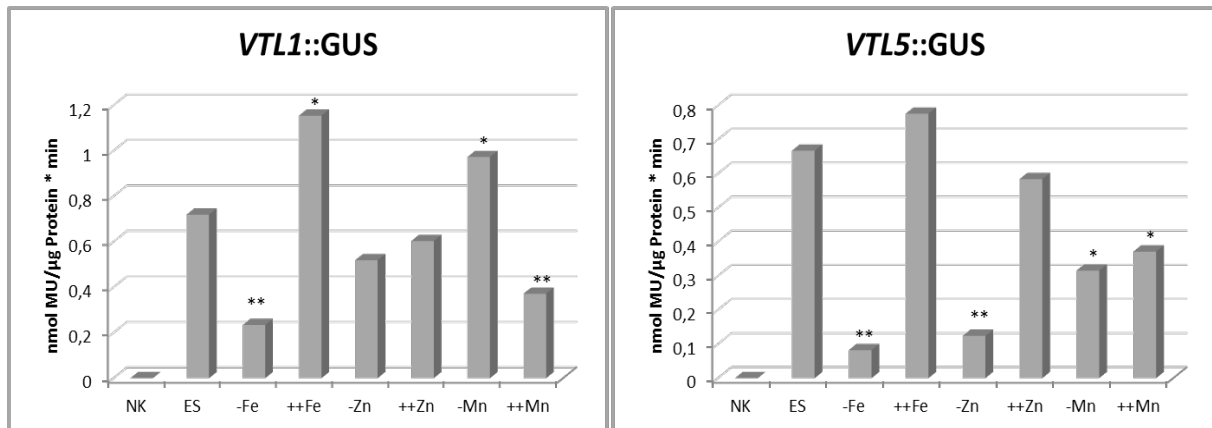


Abbildung 13: Fluorometrischer GUS-Assay zur Analyse der ernährungsspezifischen Aktivität des *VTL1* und *VTL5* Promotors. Der fluorometrische GUS-Assay erfolgte an 10 Tage alten Keimlingen die auf ES-Vollmedium (40 µM Fe, 1 µM Zn, 14 µM Mn), Mangelmedium (-Fe, -Zn, -Mn) oder Überschussmedium (++) (++)Fe = 120 µM, ++Zn = 5 µM, ++Mn = 28 µM) angezogen wurden. Unter Eisenmangel ist die Expression von GUS sowohl unter der Kontrolle des *VTL1*, wie auch des *VTL5* Promotors verringert, bzw. unter Überschuss erhöht. Zusätzlich ist die Aktivität von GUS in den *VTL5* transgenen Pflanzen unter Zn-Mangel verringert. Auch bei unterschiedlicher Manganfütterung ist die Expression geringer als unter Normalernährung. Außerdem sieht man eine leichte Erhöhung unter Manganmangel bzw. eine Verringerung der Expression unter Manganüberschuss in *VTL1* transgenen Pflanzen (*, $p < 0,01$; **, $p < 0,005$).

3.3.3 Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) Analyse der ernährungsabhängigen Expression von *VTL1*, 2 und 5

Die ernährungsspezifische Expression von *VTL1*, *VTL5* und zusätzlich von *VTL2* wurde außerdem mittels quantitativer PCR Analyse untersucht. Eine Analyse von *VTL3* und *VTL4* war nicht möglich, da keine Primer mit einer ausreichenden Effizienz, aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit der *VTL* Gene untereinander, synthetisiert werden konnten. Für die Analyse wurde die RNA von 10 Tage alten Keimlingen isoliert, die unter verschiedenen Ernährungsbedingungen (siehe Abb. 14) angezogen wurden. Auch hier ist eine deutliche eisenabhängige Expression sichtbar. Die Expression von allen drei Genen ist unter Eisenmangel stark reduziert, bzw. unter Überschuss eindeutig erhöht gegenüber den Kontrollpflanzen. Die verringerte Expression von *VTL5* unter Zinkmangel von den GUS-Daten wurde bestätigt. Gleichzeitig wurde auch eine signifikante Abnahme der Expression von *VTL1* und *VTL2* unter Zinkmangel gemessen. Es zeigte sich jedoch bei allen drei Genen keine Veränderung, wenn sie unter Zinküberschuss angezogen wurden. Auch liegt eine signifikante Zunahme der Expression von *VTL1* unter Manganmangel vor. Unter Manganüberschuss konnte aber keine signifikante Abnahme, sondern eher ebenfalls eine leichte Zunahme detektiert werden (Abb. 14). Die qRT-PCR Daten bestätigen größtenteils die GUS-Ergebnisse, so dass sich die Annahme, dass es sich bei *VTL1*, 2 und 5 hauptsächlich um Eisentransporter mit der Fähigkeit auch andere zweiwertige Metalle zu transportieren, verfestigt.

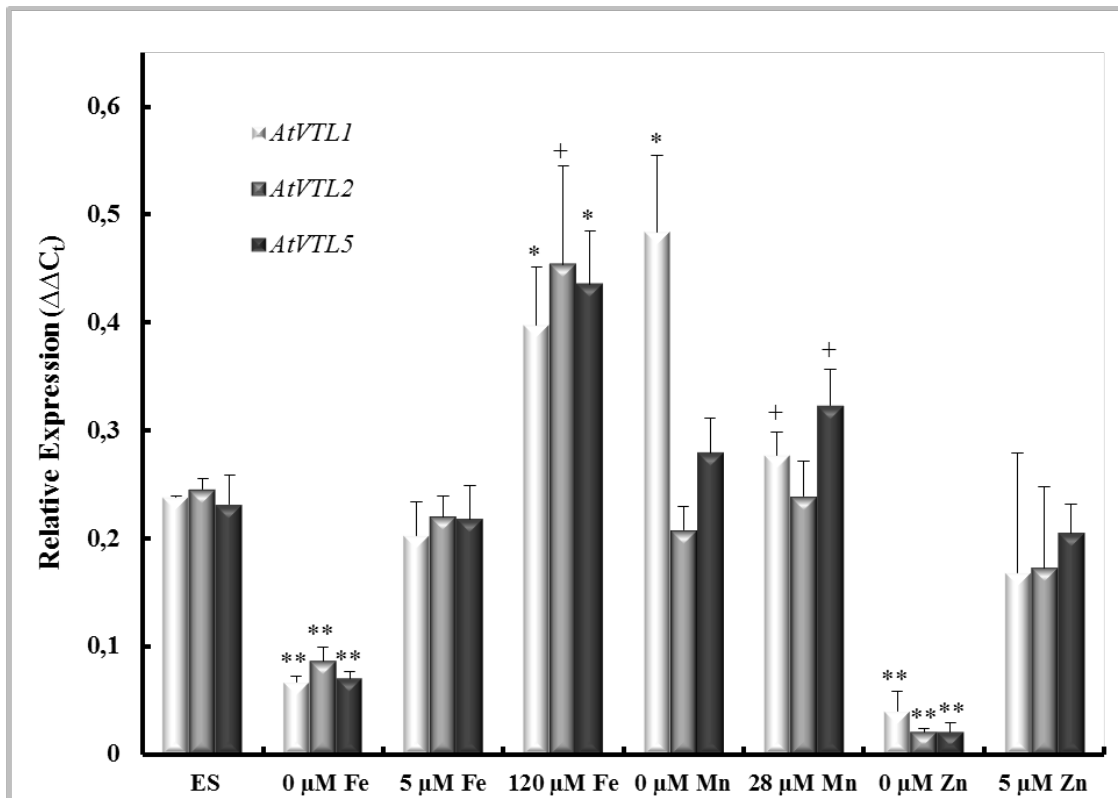


Abbildung 14: qRT-PCR Analyse der ernährungsspezifischen Expression von *VTL1*, 2 und 5. Es wurde die RNA von 10 Tage alten Keimlingen isoliert, die auf ES Medium mit der entsprechenden Zusammensetzung (siehe Grafik) angezogen wurden. Die qRT-PCR wurde anhand der Expression des Haushaltsgens *Actin2* standardisiert (**, $p < 0.001$; *, $p < 0.01$; +, $p < 0.05$). Unter Eisen- und Zinkmangel ist die Expression aller drei *VTL* Gene signifikant verringert und unter Eisenüberschuss erhöht. Zusätzlich ist die Expression von *VTL1* unter Manganmangel signifikant erhöht.

3.4 Untersuchung der Funktion der VTL-Proteine mittels verschiedener Hefemutanten (Hefekomplementationsversuche)

Um die Funktion der VTL-Proteine zu untersuchen und eventuell mehr Ergebnisse zu erhalten, die eine mögliche Metall-Transport-Funktion unterstützen, wurden zuerst Hefekomplementationsversuche mit verschiedenen Hefemutanten durchgeführt, die jeweils eins der *VTL* Gene überexprimieren. Dafür wurden die kodierenden Sequenzen der *VTL* Gene in den Expressionsvektor pUE1 unter der Kontrolle des konstitutiv exprimierenden Promotors pGK kloniert und die Konstrukte in die Hefezellen transformiert (siehe 2.2.7). Die Selektion erfolgte auf SD-ura Medium für drei Tage bei 28 °C.

3.4.1 Komplementation der $\Delta ccc1$ Hefemutante

Wie in *Arabidopsis* ist die Vakuole in Hefen das größte Eisenspeicherorgan. Sie schützt die Zellen vor toxischen, zytoplasmatischen Eisenkonzentrationen und ermöglicht gleichzeitig ein Wachstum über mehrere Generationen auf eisenfreiem Medium. Das *CCC1* Gen kodiert für einen $\text{Fe}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ Transporter, der die Eisenaufnahme in die Vakuole katalysiert. Die $\Delta ccc1$ Hefemutante kann nicht auf Medien mit einer toxischen Eisenkonzentration ($> 3 \text{ mM}$)

wachsen (Li et al. 2001). Aufgrund der Sequenzähnlichkeit der VTL-Proteine zu CCC1p aus Hefe und VIT1 aus *Arabidopsis* wurden zuerst Komplementationsversuche mit der $\Delta ccc1$ Mutante durchgeführt. Dafür wurden die $\Delta ccc1$ Zellen jeweils mit dem Leervektor pUE1 oder mit einem der *VTL* Gene transformiert und ihre Wachstumsfähigkeit auf eisenhaltigem Medium (YPD-Medium + 7 mM FeSO₄) untersucht. Alle *VTL* Gene sind in der Lage den Mutanten-Phänotyp zu komplementieren (Abb. 15), so dass man davon ausgehen kann, dass sie alle Eisen transportieren und so die zytosolische Eisenkonzentration senken können.

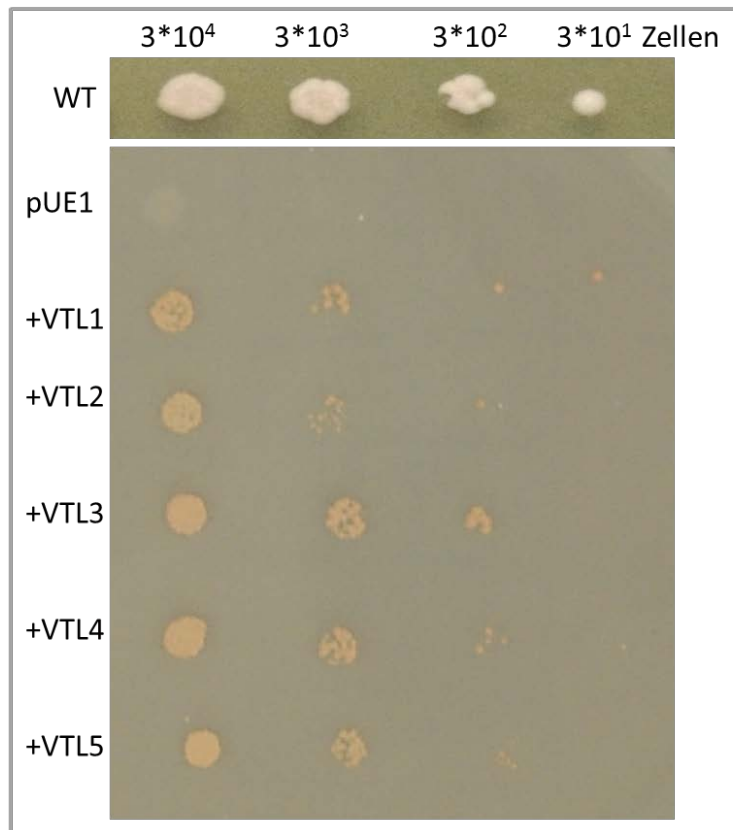


Abbildung 15: Komplementation der $\Delta ccc1$ Hefemutante. Der Wildtyp und die mit dem Leervektor pUE1 oder eines der *VTL* Gene transformierten Hefezellen wurden auf YPD Medium mit 7 mM FeSO₄ ausgebracht und für drei Tage bei 28 °C inkubiert. Alle *VTL* Gene sind in der Lage den Mutanten-Phänotyp zu komplementieren.

3.4.2 Komplementation der $\Delta pmr1$, $\Delta smf1$ und $\Delta zrc1$ Hefemutante

Um die Metall-Spezifität der *VTL* Gene zu untersuchen, wurden Komplementationsversuche mit weiteren Metall-Transport defizienten Hefezellen durchgeführt. Zrc1 ist neben Cot1 ein im Tonoplasten lokalisierter Zinktransporter, der die Aufnahme von Zink in die Vakuole katalysiert (Li & Kaplan, 1998). Die Überexpression eines der beiden Gene führt zur Erhöhung der Zink-Toleranz, bzw. der *knockout* zur Verringerung (Conklin et al. 1994; Conklin et al. 1992; Kamizono et al. 1989). Die $\Delta zrc1$ Mutante ist nicht in der Lage, auf Medien mit erhöhter Zinkkonzentration (> 5 mM ZnSO₄) zu wachsen (Lin et al. 2008). In dieser Arbeit wurden Komplementationsversuche auf YPD-Medium mit einer

Zinkkonzentration von 4–7 mM ZnSO_4 durchgeführt. Es konnten jedoch keine positiven Komplementationereignisse mit den *VTL* Genen detektiert werden (Abb. 16). Um zu untersuchen, ob die *VTL* Gene Mangan transportieren können, wurden zwei verschiedene Hefestämme verwendet, die an verschiedenen Stellen der Mangan-Homöostase ausgeschaltet sind. Mangan ist, wie Eisen, essentiell für das Zellwachstum (Loukin & Kung, 1995), jedoch in zu hohen Konzentrationen toxisch. Die Manganaufnahme erfolgt hauptsächlich über den Plasmamembranlokalisierten Transporter SMF1p (Supek et al. 1996). Die Δsmf1 Mutante ist nicht fähig auf Mangan-Mangelmedium (Zusatz von $> 0,5$ mM EGTA) zu wachsen. Wie in Abbildung 17b gezeigt, ist *VTL1* in der Lage, die Δsmf1 Mutante schwach zu komplementieren. *Pmr1p* (auch als BSD1 bekannt) ist eine am Golgi Apparat lokalisierte P-Typ ATPase die Ca^{2+} und Mn^{2+} Ionen in den Golgi transportiert (Lapinskas et al. 1995; Antebi & Fink, 1992; Rudolph et al. 1989). Innerhalb dieser Arbeit war die Δpmr1 *knockout* Mutante nicht fähig auf Medien mit einer Mangankonzentration größer als 0,7 mM MnCl_2 zu wachsen. Wie in Abbildung 17a zu sehen ist, ist *VTL1* in der Lage, den Phänotyp der Mutante schwach zu komplementieren. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass *VTL1* neben Eisen auch Mangan transportieren kann.

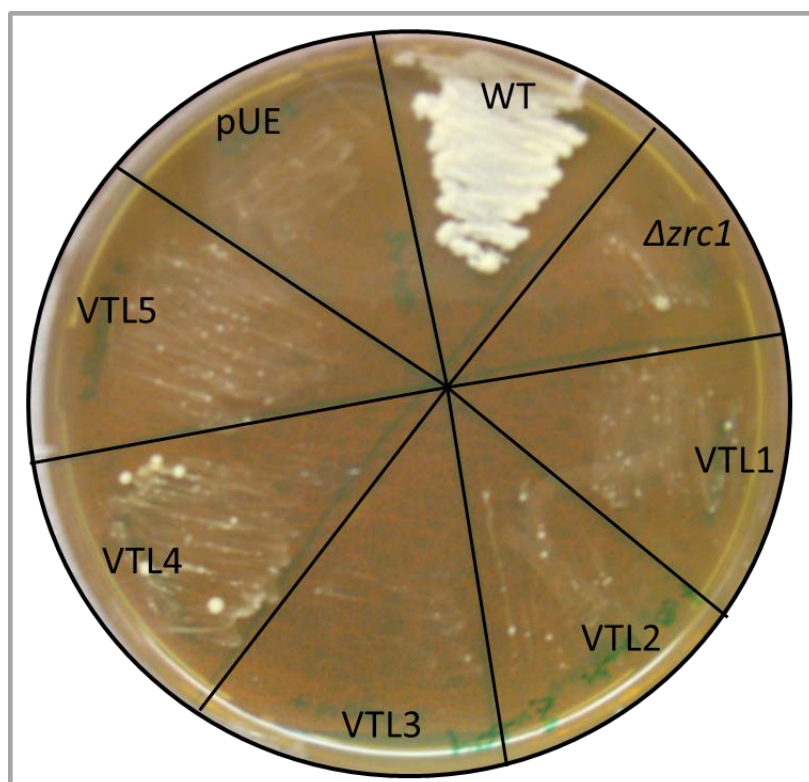


Abbildung 16: Komplementation der Δzrc1 Hefemutante. Der Wildtyp und die mit dem Leervektor pUE1 oder eines der *VTL* Gene transformierten Hefezellen wurden auf YPD Medium mit 5 mM ZnSO_4 ausgebracht und für drei Tage bei 28 °C inkubiert. Kein *VTL* Gen ist in der Lage den Mutanten-Phänotyp zu komplementieren.

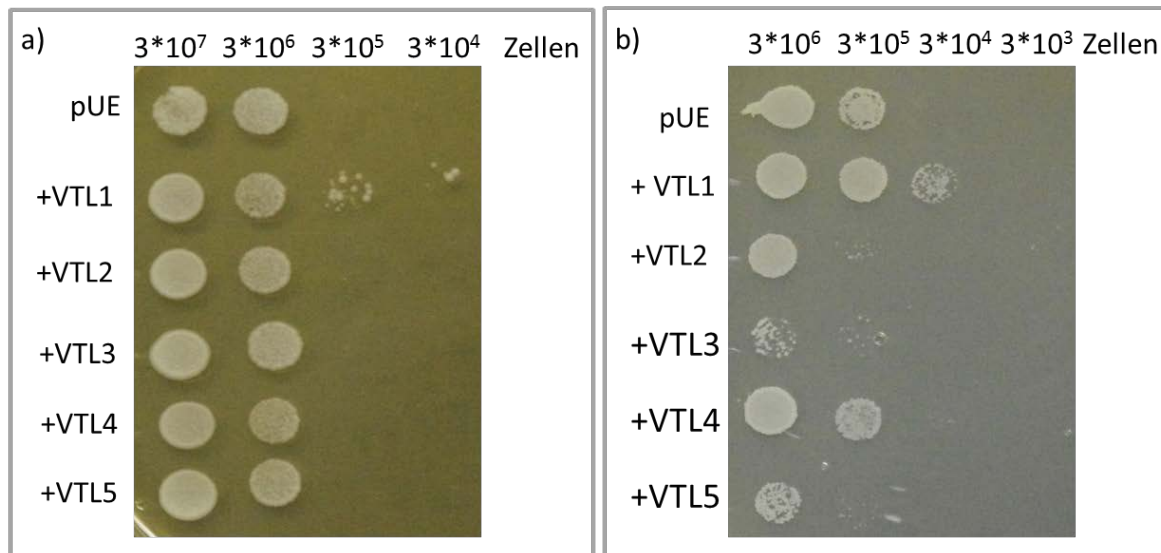


Abbildung 17: Komplementation der *Δpmr1*(a) und *Δsmf1* (b) Hefemutante. Die mit dem Leervektor pUE1 oder eines der *VTL* Gene transformierten Hefezellen wurden auf YPD Medium mit 0,75 mM MnCl_2 (a) oder SD-ura + 50 mM MES pH 6,1 + 2,5 mM EGTA (b) ausgebracht und für drei Tage bei 28 °C inkubiert. Das *VTL1* Gen ist in der Lage beide Mutanten-Phänotypen schwach zu komplementieren.

3.4.3 Bestimmung der Eisenkonzentration in Vakuolen von *VTL* überexprimierenden *Δccc1* Hefezellen

Durch die Komplementation des *Δccc1* Phänotyps konnte gezeigt werden, dass die *VTL* Gene in der Lage sind, Eisen zu transportieren, es bleibt jedoch weiterhin die Frage offen, wo sie lokalisiert sind und in welches Organell das Eisen transportiert wird oder ob es aus der Zelle exportiert wird. Um zu untersuchen, ob die *VTL*-Proteine wie *VIT1* das Eisen in die Vakuole transportieren, wurden die Vakuolen von *Δccc1* Zellen, die mit dem leeren pUE1 Vektor oder mit einem der *VTL* Gene transformiert waren, mittels Ficoll Gradient isoliert (2.2.9) und ihre Eisenkonzentration gemessen. Die Vakuolen der Zellen, die das *VTL1*, 2 oder 5 Gen überexprimieren, zeigen eine signifikant erhöhte Eisenkonzentration gegenüber den Kontrollvakuolen (Abb. 18a). Zusätzlich wurden *VTL1* und 2 mit einem *His-tag* markiert und sowohl der Komplementationsversuch, wie auch der Ficoll-Gradient erneut durchgeführt. Auch die rekombinanten Proteine sind in der Lage, den Mutanten-Phänotyp zu komplementieren (Abb. A6). Der Ficoll-Gradient wurde fraktioniert und je 500 μl einer Fraktion mittels Dot-Blot auf eine Membran übertragen. Die Lokalisation der *His-tag* markierten Proteine wurde mittels Antikörpermarkierung detektiert. Außerdem wurde die Eisenkonzentration der einzelnen Fraktionen gemessen. Gezeigt ist als Beispiel das Ergebnis von *VTL1*. Wie man in Abbildung 18b sehen kann, korreliert eine eindeutige Antikörpermarkierung mit der Vakuolenfraktion im Gradienten und einer erhöhten Eisenkonzentration. Anhand der Ergebnisse kann angenommen werden, dass wie *VIT1*, *VTL1*, *VTL2* und *VTL5* an der Vakuolenmembran lokalisiert sind und Eisen in die Vakuole

transportieren. Auch im unteren Bereich des Gradienten sind eindeutige His-Signale detektierbar. Da man davon ausgehen kann, dass während des Versuchs viele Vakuolen geplatzt sind und andere auf dem Weg durch den Gradienten an anderen Phasen hängengeblieben sind, ist das ein nachvollziehbares Ergebnis. Abbildung 18c zeigt die Negativkontrolle für die His-Antikörpermarkierung. Der Dot-Blot wurde von einem Gradienten mit *VTL1* überexprimierenden Zellen durchgeführt. Um zu bestätigen, dass sich in der Vakuolenfraktion wirklich und fast ausschließlich Vakuolen befinden, wurde die Fraktion auf einem kontinuierlichen Saccharosegradienten erneut zentrifugiert und anschließend die Aktivität von bekannten Markerenzymen gemessen. Wie zu erwarten war, korreliert die Aktivität der Bafilomycin-abhängigen ATPase (Vakuolenmarker) mit dem Proteingehalt. Die Aktivität für die Vanadat-abhängige ATPase (Plasmamembranmarker) und die Cytochrom c Reduktase (ER Marker) waren unterhalb der Nachweisgrenze (Abb. A7).

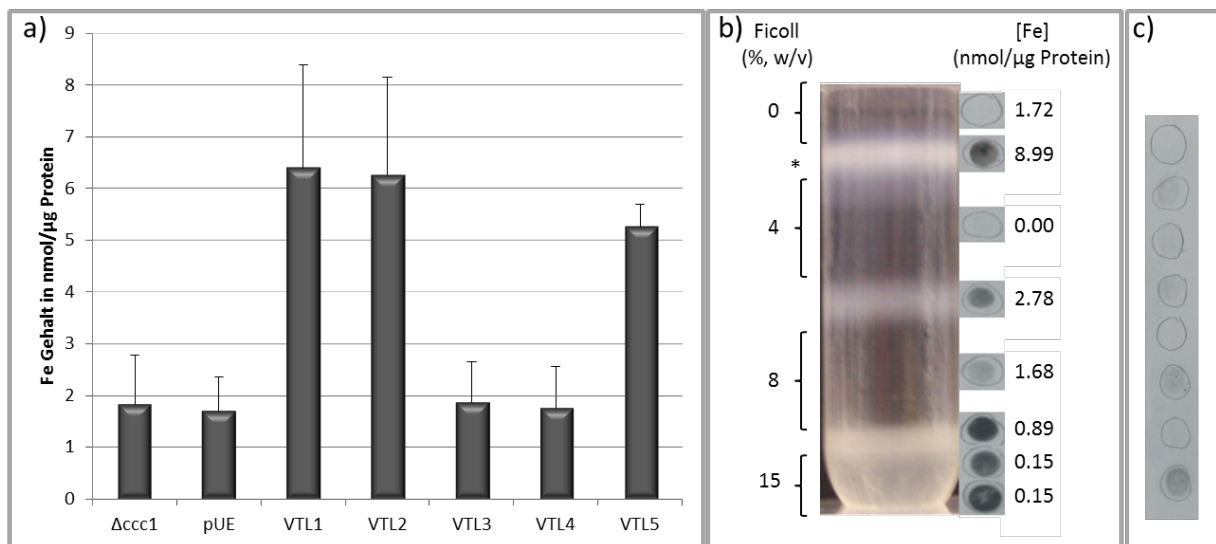


Abbildung 18: Bestimmung der Eisenkonzentration von Vakuolen aus $\Delta ccc1$ Zellen, transformiert mit *VTL1-5*. a) Die Zellen wurden in SD-/ura Medium + 1 mM FeSO_4 angezogen und bei einer $\text{OD}_{600} = 0,3 - 0,5$ geerntet. Die Isolation der Vakuolen erfolgte mittels Ficoll-Gradient und der Eisengehalt wurde pro μg Protein berechnet. Die Vakuolen aus Zellen welche *VTL1*, 2 oder 5 überexprimieren enthalten signifikant mehr Eisen, als die Kontrollvakuolen. b) Ficoll-Gradient. Das Sternchen markiert die Vakuolenfraktion an der Grenze zwischen 0 und 4 % Ficoll. Gezeigt ist *VTL1-His6*. Eine Lokalisation erfolgte mittels Dot-Blot und anti-His Antikörpermarkierung der einzelnen Fraktionen, zusätzlich ist die korrespondierende Eisenkonzentration der Fraktionen mit angegeben. Es konnte eine Übereinstimmung von Vakuolenfraktion, Antikörpersignal und hoher Eisenkonzentration detektiert werden. c) Negativkontrolle der anti-His Antikörpermarkierung. Dot-Blot von einem Gradienten von *VTL1* überexprimierenden Zellen.

3.5 Lokalisation der *VTL* Gene in Pflanzenzellen mittels Markergen mCherry

Um eine Lokalisation der VTL-Proteine in Pflanzenzellen zu untersuchen wurden rekombinante VTL-mCherry Proteine hergestellt. Innerhalb von zwei Masterarbeiten, durchgeführt in der Arbeitsgruppe, konnten wir die Lokalisation für VTL1 und VTL4 detektierten (J. Pfohl, 2013; W. Li, 2014).

3.5.1 Lokalisation von mCherry-VTL1

Für VTL1 konnte ein N-terminales Konstrukt erfolgreich kloniert und sowohl stabil in *Arabidopsis*, als auch transient in Tabak transformiert werden. Für die genaue Lokalisierung wurde jeweils Blattmaterial geerntet, daraus Protoplasten isoliert und diese mit einem Leica-Konfokalmikroskop analysiert. Zur besseren Orientierung wurde neben dem mCherry-Signal zusätzlich das Chlorophyll angeregt und detektiert. In den Protoplasten ist sowohl ein eindeutiges mCherry-Signal (blau), wie auch ein Chlorophyll-Signal (gelb) zu sehen, welche gut voneinander getrennt werden können, wobei das mCherry-Signal membranständig lokalisiert ist (Abb. 19 A und B, entnommen aus Masterarbeit Julius Pfohl, 2013). Nach Zugabe von 60 %iger Saccharoselösung schrumpft die mCherry-VTL1 markierte Membran zusammen. Das Chlorophyll-Signal befindet sich nun eindeutig außerhalb der Membran (Abb. 19 C, entnommen aus Julius Pfohl, 2013). Dieses Ergebnis deutet auf eine Lokalisation von mCherry-VTL1 in der Vakuolenmembran hin. Um dies genauer zu untersuchen, wurden Tabakblätter (*N. benthamiana*) transient mit dem mCherry-VTL1 Konstrukt und dem Tonoplastenmarker PTR2-YFP kotransformiert, Protoplasten isoliert und erneut die Signale detektiert. Das YFP-Signal wurde mit 514 nm angeregt und bei 520 bis 535 nm detektiert. In den Protoplasten wurden eindeutig Signale für mCherry-VTL1 und PTR2-YFP gefunden. Beide Signale sind in der gleichen Membran und eindeutig innerhalb der Chloroplasten lokalisiert (Abb. 20 A und B, entnommen aus Julius Pfohl, 2013). Beruhend auf diesem und vorrangegangenen Ergebnissen kann man davon ausgehen, dass das VTL1 Protein in der Vakuolenmembran lokalisiert ist.

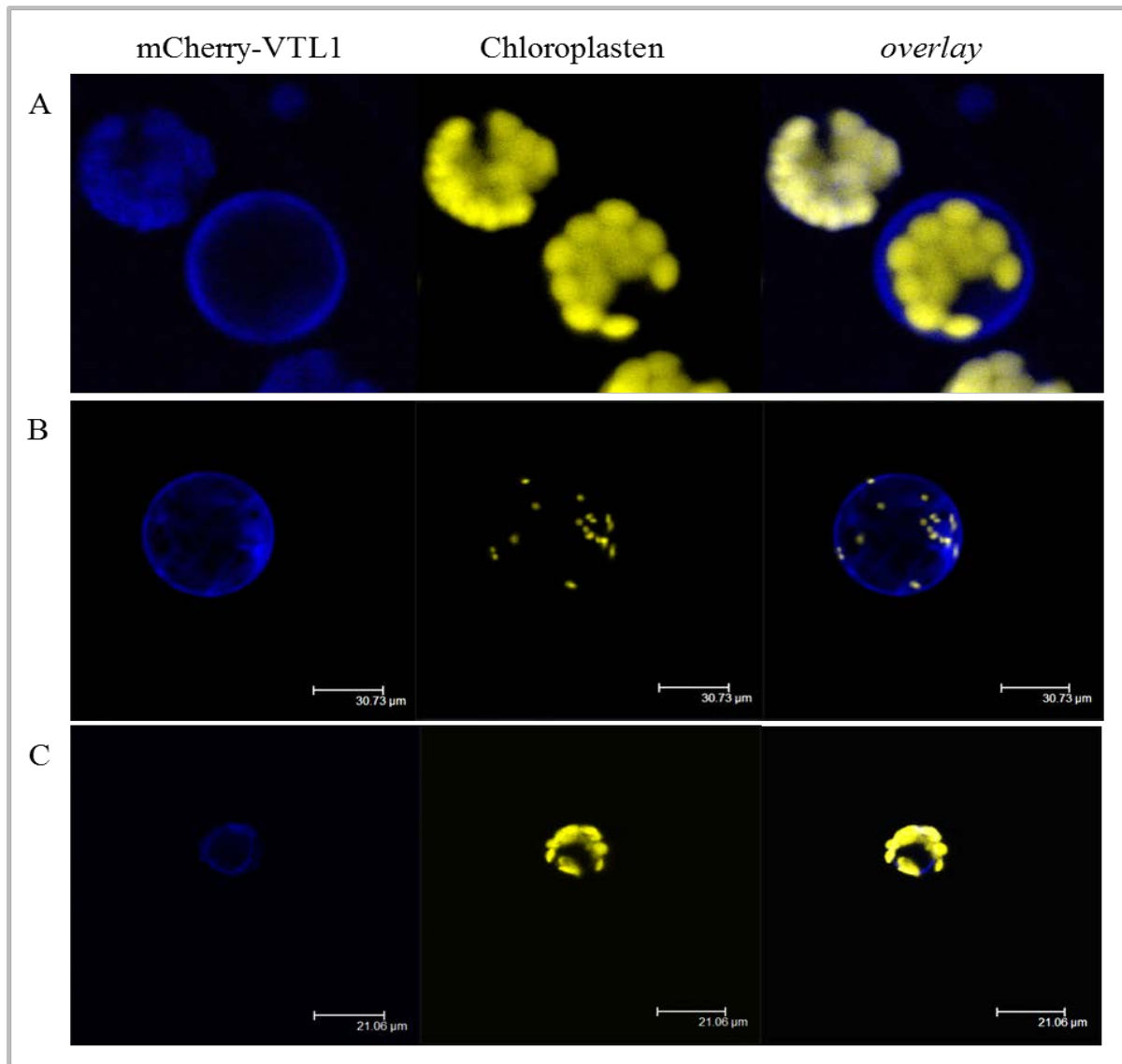


Abbildung 19: Lokalisationsbilder von Protoplasten aus mit mCherry-VTL1 transformierten Pflanzen (entnommen aus der Masterarbeit von Julius Pfohl, 2013). Vergrößerung: 20x. Das mCherry-Signal ist blau, Anregung bei 543 nm, Detektion bei 590-650 nm. Das Chlorophyll-Signal ist gelb, Anregung bei 488 nm, Detektion bei 660-760 nm. A, B und C zeigen drei verschiedene Protoplasten. C ist mit Zugabe von 60 % Saccharoselösung. Das mCherry-Signal wird membranständig unterhalb der Chloroplasten lokalisiert.

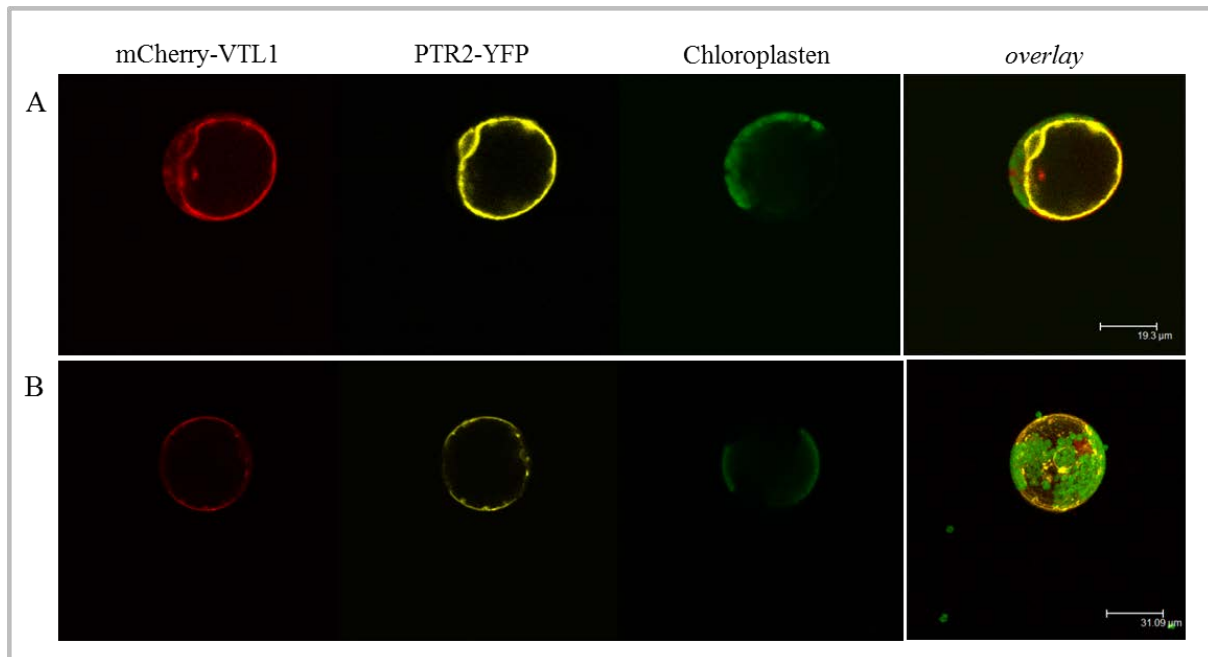


Abbildung 20: Lokalisationsbilder von Protoplasten aus mit mCherry-VTL1 und PTR2-YFP transformierten Tabakblättern (entnommen aus der Masterarbeit von Julius Pfohl, 2013). Vergrößerung: 20x. Das mCherry-Signal ist rot, Anregung bei 543 nm, Detektion bei 590-650 nm. Das YFP-Signal (Tonoplastmarker) ist gelb, Anregung bei 514 nm, Detektion bei 520–535 nm. Das Chlorophyll-Signal ist grün, Anregung bei 488 nm, Detektion bei 660-760 nm. Die mCherry- und YFP-Signale sind deckungsgleich, membranständig und unterhalb der Chloroplasten lokalisiert, was eine Lokalisation für VTL1 in der Vakuolenmembran zeigt. A und B zeigen zwei verschiedene Protoplasten. Das *overlay* bei B ist eine zusammengerechnete 3D Darstellung.

3.5.2 Lokalisation von mCherry-VTL4

Für VTL4 konnte ebenfalls ein N-terminales Konstrukt erfolgreich kloniert und transient in Tabakblätter transformiert werden. Bei der ersten Betrachtung der Blätter nach zwei Tagen mit dem Konfokalmikroskop konnte ein eindeutiges mCherry-Signal membranständig detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Für die genaue Lokalisierung wurden Tabakblätter nun mit dem mCherry-VTL4 Konstrukt und dem Plasmamembranmarker PTR1-YFP oder dem Tonoplastmarker PTR2-YFP kotransformiert, nach zwei Tagen das Blattmaterial geerntet und mikroskopisch ausgewertet. In den Blättern wurden eindeutig Signale für mCherry-VTL4 und PTR1-YFP gefunden. Beide Signale sind in der gleichen Membran lokalisiert (Abb. 21, entnommen aus Weiqiong Li, 2014). Um sich zu überzeugen, dass die Lokalisation in der Plasmamembran korrekt ist, wurden außerdem die Blätter nach der Transformation mit mCherry-VTL4 und dem Tonoplastmarker PTR2-YFP mit Saccharoselösung behandelt und ausgewertet. Wie man in Abbildung 22 sehen kann, ist das mCherry-Signal (blau) und das YFP-Signal (gelb) in zwei voneinander getrennten Membranen detektierbar, wobei das YFP-Signal in der inneren Membran zu finden ist (Abb. entnommen aus Weiqiong Li, 2014). Die Ergebnisse mit den vorhandenen Markern zeigen für VTL4 eine Lokalisation in der Plasmamembran der Pflanzenzellen.

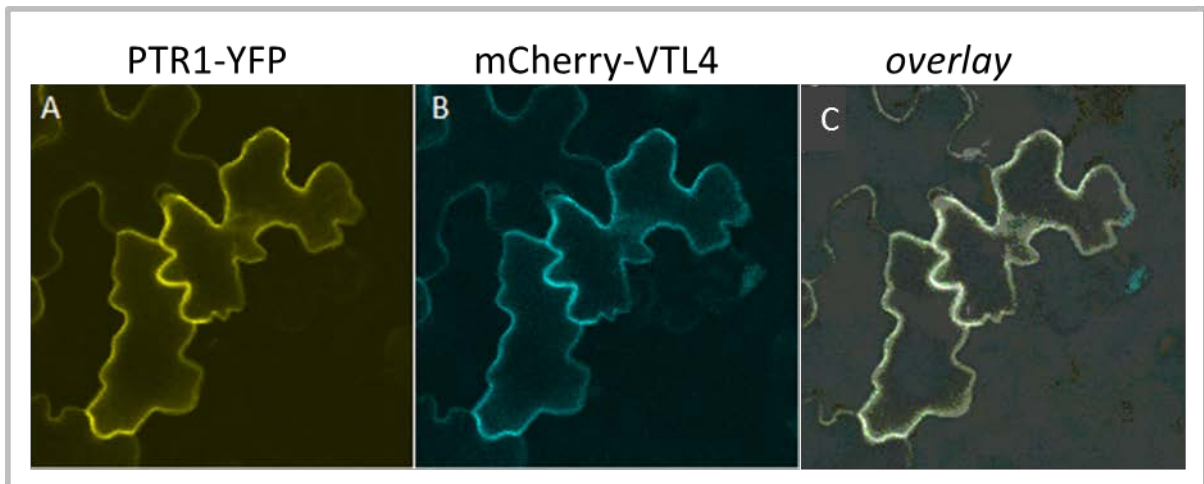


Abbildung 21: Lokalisationsbilder von mit mCherry-VTL4 und PTR1-YFP (Plasmamembranmarker) transformierten Tabakblättern (entnommen aus der Masterarbeit von Weiqiong Li, 2014). Vergrößerung: 20x. Das mCherry-Signal ist blau (B), Anregung bei 543 nm, Detektion bei 590-650 nm. Das YFP-Signal ist gelb (A), Anregung bei 514 nm, Detektion bei 520-535 nm. Die mCherry- und YFP-Signale sind denkungsgleich (C) und membranständig lokalisiert.

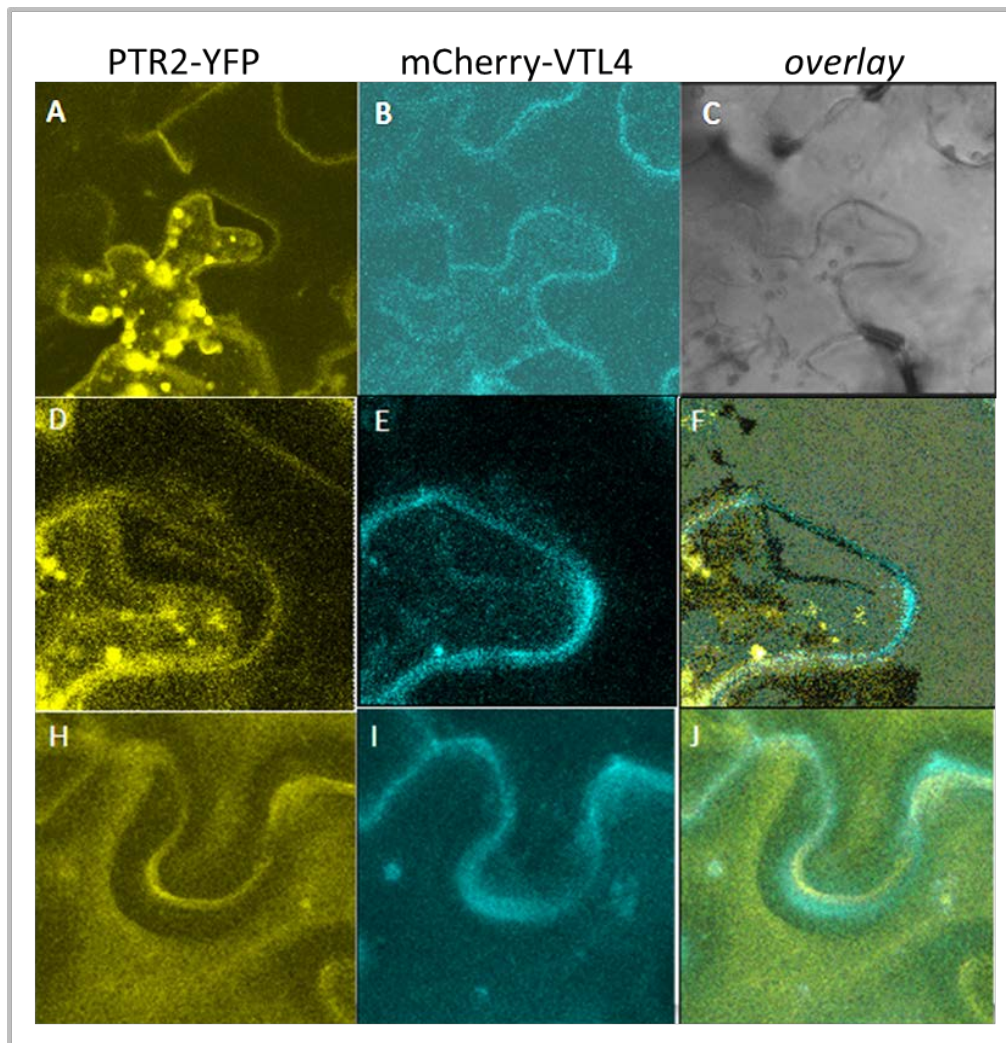


Abbildung 22: Lokalisationsbilder von mit mCherry-VTL4 und PTR2-YFP (Tonoplastmarker) transformierten Tabakblättern (entnommen aus der Masterarbeit von Weiqiong Li, 2014). Die Blätter wurden für 20 min in 60 %iger Saccharoselösung inkubiert. Vergrößerung: 20x. Das mCherry-Signal ist blau (B, E, I), Anregung bei 543 nm, Detektion bei 590-650 nm. Das YFP-Signal ist gelb (A, D, H), Anregung bei 514 nm, Detektion bei 520-535 nm. Die mCherry- und YFP-Signale sind in zwei voneinander getrennten Membranen lokalisiert, siehe *overlay* (F und J). C = Durchlicht von A und B.

3.5.3 Bestimmung der Eisenkonzentration von *VTL4* überexprimierenden Hefezellen

Eine Lokalisation von *VTL4* in der Plasmamembran würde auch die Komplementation der $\Delta ccc1$ Hefemutante erklären, wenn man davon ausgeht, dass *VTL4* Eisen aus der Zelle heraus transportiert. Um dies zu überprüfen wurde die Eisenkonzentration von $\Delta ccc1$ Zellen, die mit *VTL4*-pUE1, *VTL1*-pUE1 oder dem Leerkonvektor pUE1 transformiert waren, gemessen. Dafür wurden die Zellen in SD-ura Medium + 1 mM FeSO_4 bis zu einer $\text{OD}_{600} = 0,8-1,0$ angezogen, geerntet, einmal in 0,9 %iger KCl-Lösung gewaschen, um externes Eisen zu entfernen und dann in definierten Volumina aliquotiert und über Nacht bei 60 °C getrocknet. Die Eisenbestimmung erfolgte mittels Säureaufschluss nach Wolfgang Schmidt. Für die Berechnung wurden drei verschiedene Bezugsgrößen verwendet. Der Proteingehalt wurde nach Bradford bestimmt, die Zellzahl wurde mit einer Thoma Zählkammer ermittelt und das Trockengewicht wurde gewogen. Die Eisenmessung ergab bei allen drei Bezugsgrößen eine signifikante Verringerung im Eisengehalt von *VTL4* überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 23, gezeigt ist das Ergebnis mit dem Proteingehalt als Bezugsgröße, entnommen aus Weiqiong Li, 2014). Die Ergebnisse der Eisenmessung unterstützen die Lokalisation von *VTL4* in der Plasmamembran und eine Eisentransportfunktion.

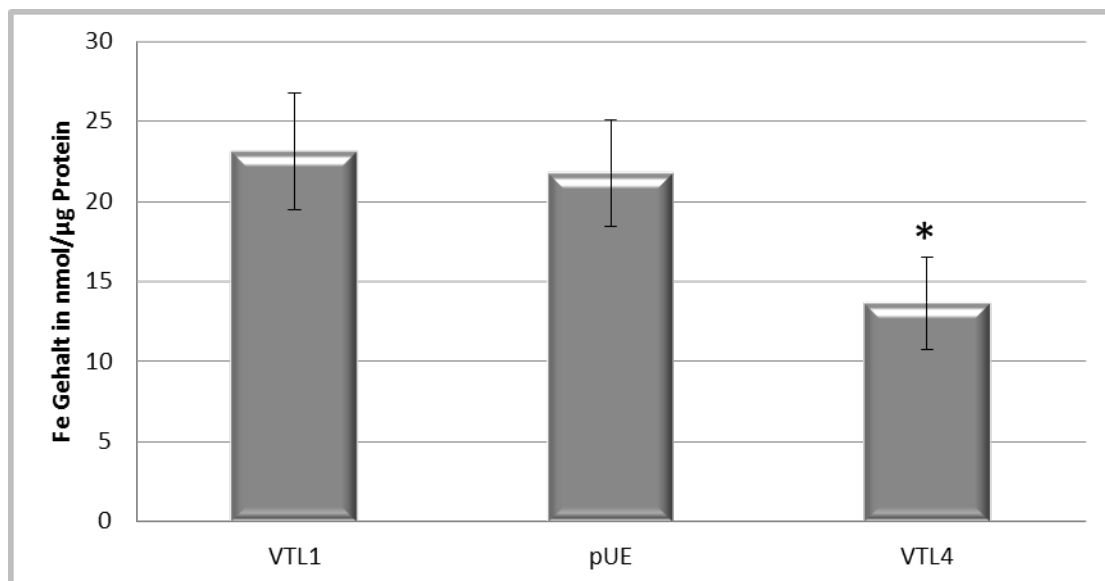


Abbildung 23: Eisenmessung von $\Delta ccc1$ Zellen transformiert mit dem Leervektor pUE1, *VTL1*-pUE1 oder *VTL4*-pUE1. Anzucht der Zellen in SD-ura Medium + 1 mM FeSO_4 . Eisenmessung mittels Säureaufschluss. Die *VTL4* überexprimierenden Zellen zeigen einen signifikant ($p < 0,05$) geringeren Eisengehalt als die Kontrollzellen (Versuch durchgeführt von Weiqiong Li im Rahmen einer Masterarbeit).

3.5.4 Bestimmung der Eisenkonzentration von *VTL3* überexprimierenden Hefezellen

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass *VTL3* in der Lage ist, den Mutanten-Phänotyp der $\Delta ccc1$ Mutante zu komplementieren. Außerdem ist die Expression von *VTL3* in *Arabidopsis* Pflanzen eisenabhängig, sie erhöht sich mit zunehmender Eisenkonzentration. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass auch *VTL3* in der Eisenhomöostase eine Rolle spielt. In Anlehnung an das Ergebnis der Eisenmessung von *VTL4* überexprimierenden Hefezellen, wurde die Eisenkonzentration von *VTL3* überexprimierenden $\Delta ccc1$ Hefezellen gemessen. Wie man in Abbildung 24 sehen kann, haben auch die *VTL3* überexprimierenden Hefezellen einen signifikant verringerten Eisengehalt verglichen mit den Kontrollzellen. Dieses Ergebnis zeigt, dass auch *VTL3* Eisen transportieren kann und lässt zusätzlich eine Lokalisation in der Plasmamembran vermuten.

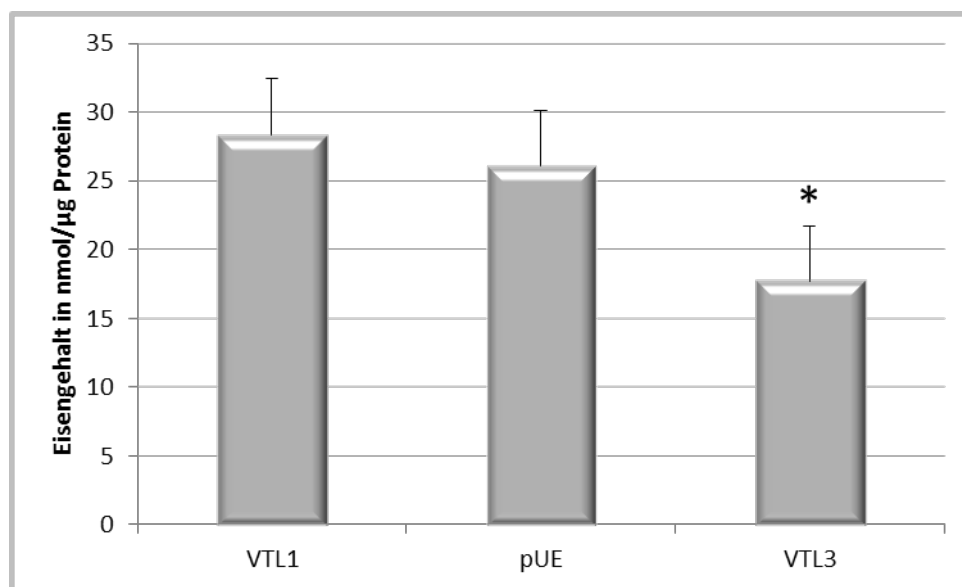


Abbildung 24: Eisenmessung von $\Delta ccc1$ Zellen transformiert mit dem Leervektor pUE1, VTL1-pUE oder VTL3-pUE1. Anzucht der Zellen in SD-ura Medium + 1 mM FeSO₄. Eisenmessung mittels Säureaufschluss. Die *VTL3* überexprimierenden Zellen zeigen einen signifikant ($p < 0,05$) geringeren Eisengehalt als die Kontrollzellen.

3.6 Komplementation der *vit1-1* und *nramp3/nramp4* *Arabidopsis* Mutanten

Um die Funktion der *VTL* Gene in Pflanzen zu charakterisieren, wurden die *VTL* Gene in verschiedenen Eisentransport defizienten *Arabidopsis* Mutanten überexprimiert und die Transformaten auf eine mögliche Komplementation hin untersucht. Hierfür wurden die kodierenden Sequenzen der *VTL* Gene in den Expressionsvektor GL1 unter der Kontrolle des konstitutiv exprimierenden Promotors CaMV35S kloniert und durch Agrobakterien-vermittelte Transformation (*Floral Dip*) in die Wirtspflanze integriert. Die erfolgreiche Überexpression konnte mittels semiquantitativer PCR in den entsprechenden Linien detektiert werden (Abb. 25).

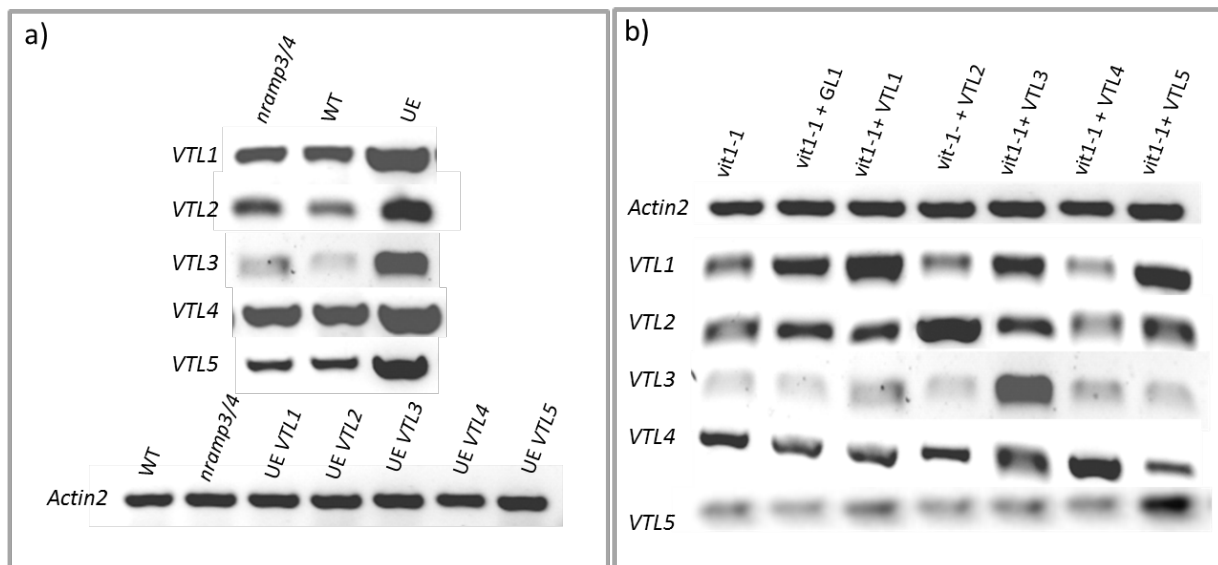


Abbildung 25: Überprüfung der Überexpression der *VTL* Gene in der *nramp3/4* (a) und *vit1* (b) Mutante von *Arabidopsis*, mittels semiquantitativer PCR Analyse. RNA Isolation aus Blattmaterial und cDNA Synthese. (Primer: siehe Tabelle 3; Klonierung in pUE1 Vektor). Die jeweilige Überexpression konnte detektiert werden.

3.6.1 Komplementation der *vit1-1* *Arabidopsis* Mutante

Das VIT1 Protein aus *Arabidopsis* ist an der Vakuolenmembran lokalisiert und katalysiert den Transport von Eisen und Mangan aus dem Zytoplasma in die Vakuole. Die größte Aktivität konnte in Parenchymzellen des Leitgefäßsystems in sich entwickelnden Embryonen gemessen werden. Die *vit1-1 knockout* Mutante zeigt einen chlorotischen und im Wachstum gehemmten Phänotyp, wenn sie auf alkalischem Boden (Boden mit schlechter Eisenverfügbarkeit) angezogen wird. Der beruht darauf, dass während der Samenbildung nicht genug Eisen in den Vakuolen der provasculären Zellen gespeichert werden kann, was dann während der Keimung zur Verfügung steht und über das vasculäre System verteilt wird (Kim et al. 2006 b). Innerhalb dieser Arbeit wurden die Samen auf ES Medium mit 0 μM Eisen und dem Zusatz von 100 μM Ferrozin (Fe^{2+} Chelator) angezogen. Nach 13 Tagen zeigten die Keimlinge einen deutlichen Phänotyp verglichen mit dem Wildtyp, sie haben ein gehemmtes Wurzelwachstum und chlorotische Keimblätter (Abb. 26). Eine Überexpression der *VTL* Gene komplementiert diesen Phänotyp, die Wurzellängen der transgenen Pflanzen sind signifikant länger als die der Mutante und sogar länger als die der Wildtyp Pflanzen (Abb. 27).

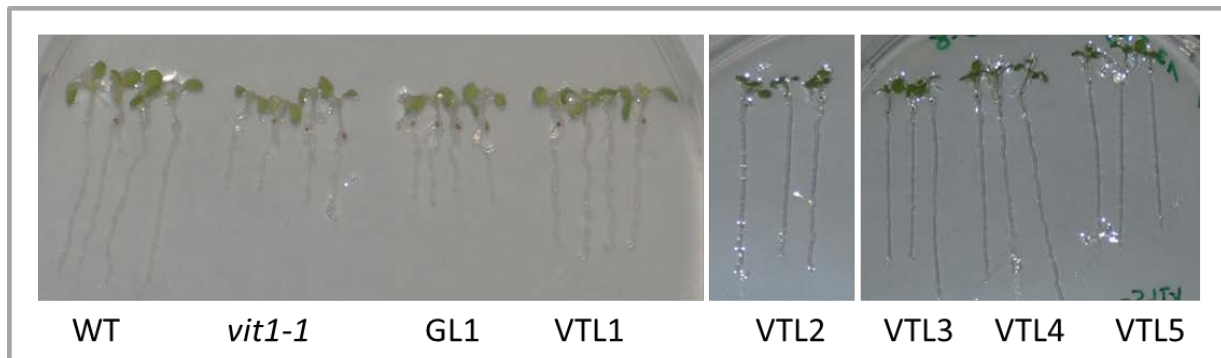


Abbildung 26: Vergleich vom Wachstum der Keimlinge der *vit1-1* Mutante alleine und transformiert mit je einem *VTL* Gen oder dem Leervektor *GL1*. Die Keimlinge wurden für 13 Tage auf ES Medium mit 0 μM Fe + 100 μM Ferrozin, angezogen und anschließend der Phänotyp analysiert. Alle *VTL* Gene sind durch Überexpression in der Lage, den *vit1-1* Mutanten-Phänotyp zu komplementieren. Die Wurzellängen der Überexpressionslinien entsprechen optisch denen des Wildtyps.

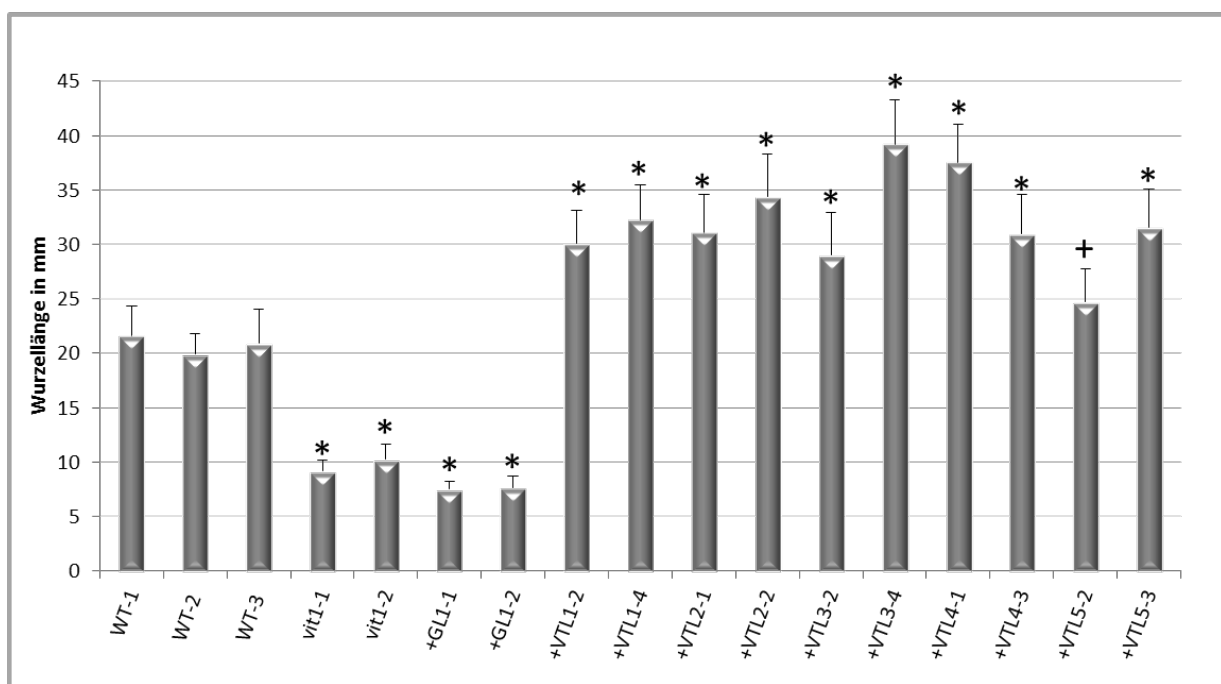


Abbildung 27: Messung und Vergleich der Wurzellängen der *vit1-1* Mutante, des Wildtyps und der transgenen Linien (*vit1-1* + *VTL* Gen). Messung der Wurzellängen von 13 Tage alten Keimlingen (*vit1-1* Mutante transformiert mit Leervektor (*GL1*) oder einem *VTL* Gen). Die Keimlinge wurden auf ES Medium mit 0 μM Eisen + 100 μM Ferrozin angezogen. Die Sternchen und das Plus markieren einen signifikanten Unterschied zum Wildtyp (*, $p < 0,001$, +, $p < 0,005$). Deutlich wird, dass die *VTL* überexprimierenden Linien deutlich längere Wurzeln, als die Mutante und sogar als der Wildtyp aufweisen.

3.6.1.1 Untersuchung der Eisenverteilung in transgenen *vit1-1* Embryonen

Die Eisenkonzentration in den *vit1-1* Samen unterscheidet sich nicht von Wildtypsamensamen, jedoch kommt es zu einer veränderten Verteilung des Eisens innerhalb der Samen. In Wildtypsamensamen ist das meiste Eisen in den Vakuolen der Zellen der provaskulären Bahnen im Hypokotyl, der Keimwurzel und den Keimblättern lokalisiert. In den Mutantensamen kommt hier kein Eisen vor, es ist eher diffus im Hypokotyl, der Keimwurzel und den Epidermiszellen der Keimblätter verteilt (Kim et al. 2006 b). Um zu untersuchen, ob die Überexpression der *VTL* Gene wieder eine Umverteilung des Eisens hervorruft oder die Komplementation eher auf der erhöhten Speicherung von Eisen in der Vakuole beruht, wurde das Eisen mittels *Perls*

Staining in Wildtyp-, Mutanten und transgenen Embryonen angefärbt. Im Wildtyp ist eine Lokalisation des Eisens im Gefäßsystem sichtbar, dagegen wirkt die Verteilung in der *vit1-1* Mutante, wie in der Literatur beschrieben, eher unspezifisch bzw. diffus (Abb. 28a). Obwohl die Überexpression der *VTL* Gene das gehemmte Wachstum der Mutante unter Eisenmangelbedingungen komplementieren kann, wirkt die Verteilung des Eisens in den transgenen Embryonen auch diffus, so dass kein Unterschied zur Mutante sichtbar ist (Abb. 28 a und b). Somit kann der Komplementations-Effekt nicht auf diesem Wege erklärt werden. Daraufhin wurde die Eisenkonzentration der Mutantensamen und transgenen Mutantensamen gemessen und mit dem Wildtyp verglichen, es konnte jedoch kein Unterschied im Eisengehalt detektiert werden (Abb. A8).

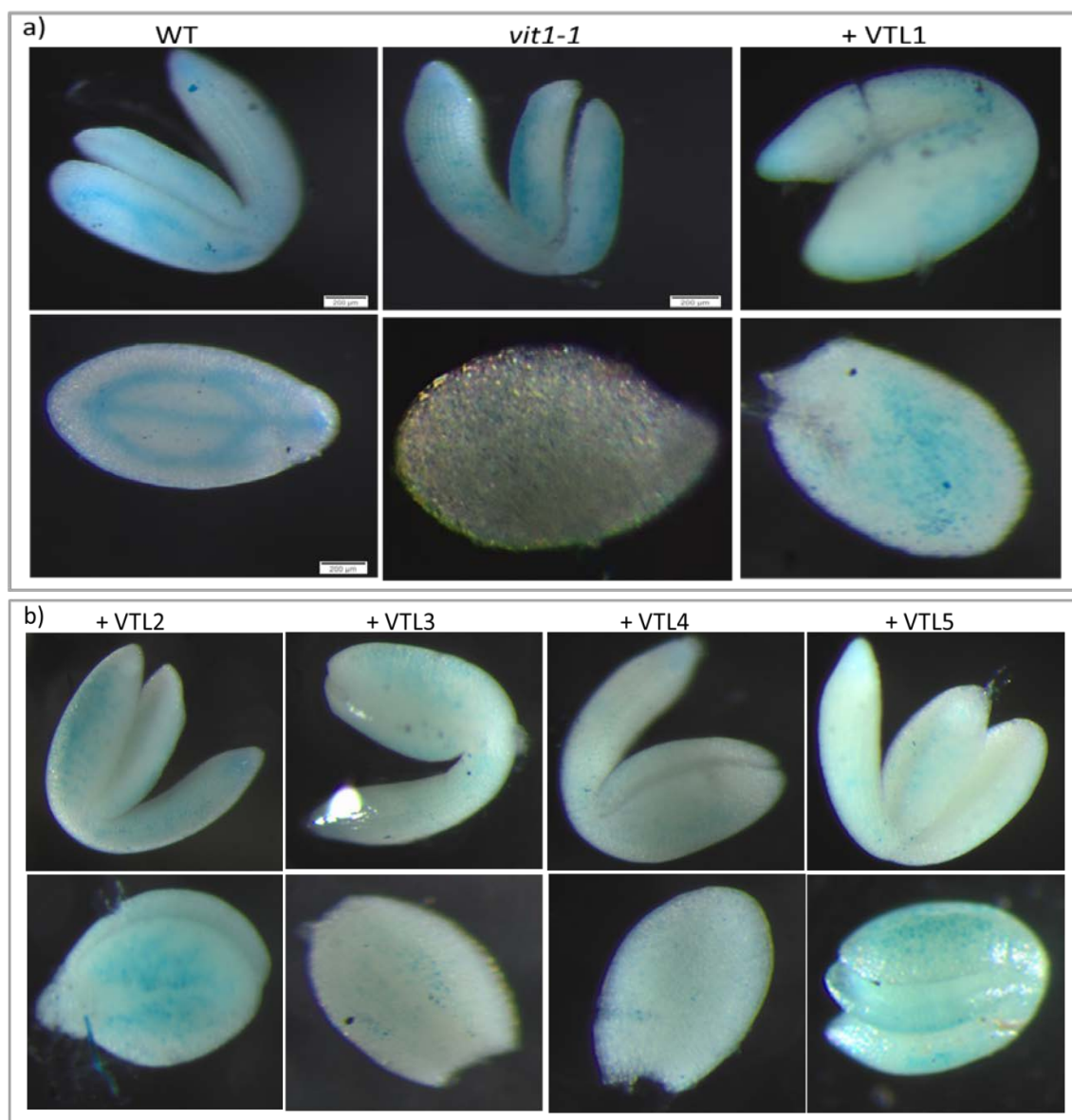


Abbildung 28: Eisenfärbung mittels Perls Staining in transgenen *vit1-1* Embryonen. Inkubation der isolierten Embryonen für 18 h in Perls Lösung. Im Wildtyp ist eine Lokalisation des Eisens im Gefäßsystem sichtbar (a). In der *vit1-1* Mutante (a) und den transgenen Embryonen (a und b) ist keine klare Lokalisation erkennbar, somit kann der Komplementations-Effekt nicht mit einer verschobenen Eisenverteilung erklärt werden.

3.6.2 Komplementation der *nramp3/nramp4 Arabidopsis* Doppelmutante

Beide Proteine, Nramp3 und Nramp4, sind Eisentransporter, die an der Vakuolenmembran lokalisiert sind und Eisen bei Bedarf aus der Vakuole ins Zytosol transportieren. Sie sind redundant. Ein Mutanten-Phänotyp zeigt sich nur in 4-5 Tage alten Keimlingen der Doppelmutante, wenn diese unter Eisenmangelbedingungen angezogen werden. Da die Keimlinge kein Eisen aus der Vakuole mobilisieren können, zeigen sie ein vermindertes Wachstum mit chlorotischen Kotyledonen und verkürzten Wurzeln. Nach 7-8 Tagen verschwindet der Phänotyp, da IRT1 exprimiert wird und Eisen aus dem Medium aufgenommen werden kann (Lanquar et al. 2005). In diesem Komplementationsversuch wurden Wildtyp, *nramp3/4* Doppelmutanten, *nramp3/4* + Leervektor (GL1) und *nramp3/4* + *VTL*-Gen Keimlinge auf ES-Medium mit 0 μ M Eisen angezogen und die Wurzellängen nach fünf Tagen Wachstum gemessen. Wie in Abbildung 29 und 30 gezeigt, haben die Keimlinge der Doppelmutante und die Doppelmutante transformiert mit dem Leervektor (GL1) deutlich verkürzte Wurzeln, verglichen mit dem Wildtyp. Die Überexpression der *VTL* Gene in der *nramp3/4* Doppelmutante komplementiert den Phänotyp. Die Wurzeln sind signifikant länger, als die der Doppelmutante, jedoch nicht so lang wie des Wildtyps. Da in der *nramp3/4* Doppelmutante Eisen Efflux Carrier ausgeschaltet sind, die *VTL* Gene in der $\Delta ccc1$ Hefe-Mutante und der *vit1-1* Mutante aber den Eisentransport in die Vakuole komplementieren, erscheinen die beiden Ergebnisse auf den ersten Blick widersprüchlich. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Überexpression der *VTL* Gene in der *nramp3/4* Doppelmutante insgesamt die Eisenkonzentration in den Samen erhöht, so dass während der Keimung mehr Eisen zur Verfügung steht und so der Phänotyp teilweise komplementiert werden kann. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde die Eisenkonzentration in den Samen der komplementierenden Linien gemessen und mit dem Eisengehalt aus Wildtyp-, und Mutantensamen verglichen. Wie aus vorherigen Ergebnissen bekannt (Lanquar et al. 2005) unterscheidet sich der Eisengehalt von Wildtyp- und Mutantensamen nicht. Auch die Vektorkontrolle (GL1-1, GL1-2) zeigt keinen veränderten Wert (Abb. 31). In den Samen der *VTL1*, 2 und 5 überexprimierenden Pflanzen konnte dagegen ein signifikant erhöhter Eisengehalt gemessen werden, was die Vermutung unterstützt. Die *VTL3* und *VTL4* transgenen Pflanzen können ebenso eindeutig den Phänotyp komplementieren, trotzdem ist hier kein veränderter Eisengehalt messbar.

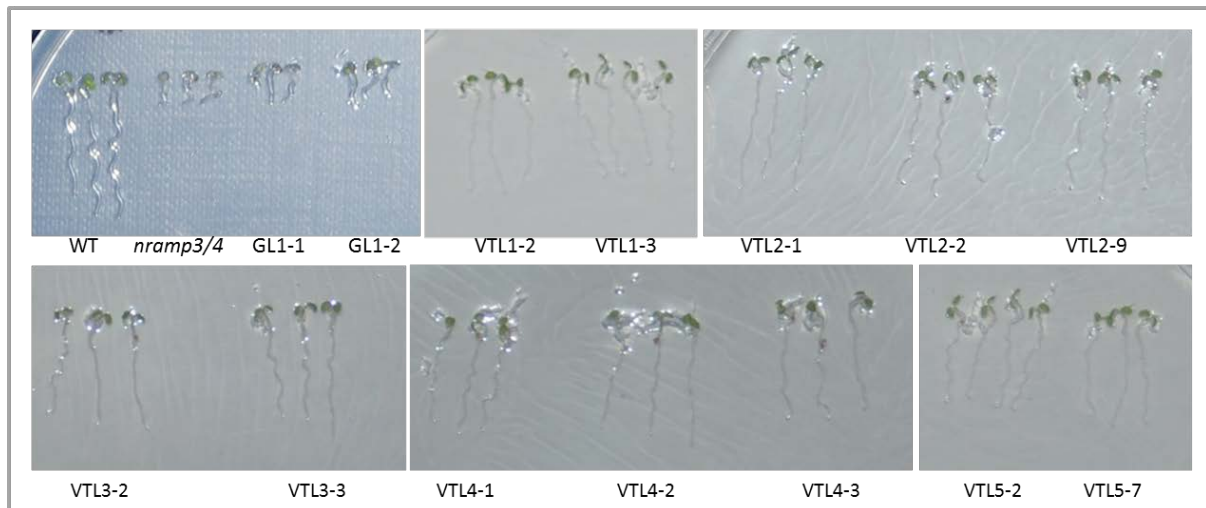


Abbildung 29: Vergleich vom Wachstum der Keimlinge der *nramp3/4* Doppelmutante alleine und transformiert mit je einem *VTL* Gen oder dem Leervektor GL1. Die Keimlinge wurden für fünf Tage auf ES Medium mit 0 μ M Fe angezogen und anschließend der Phänotyp analysiert. Alle *VTL* Gene sind durch Überexpression in der Lage, den *nramp4/nramp4* Mutanten-Phänotyp zu komplementieren. Die Wurzellängen der Überexpressionslinien entsprechen optisch denen des Wildtyps.

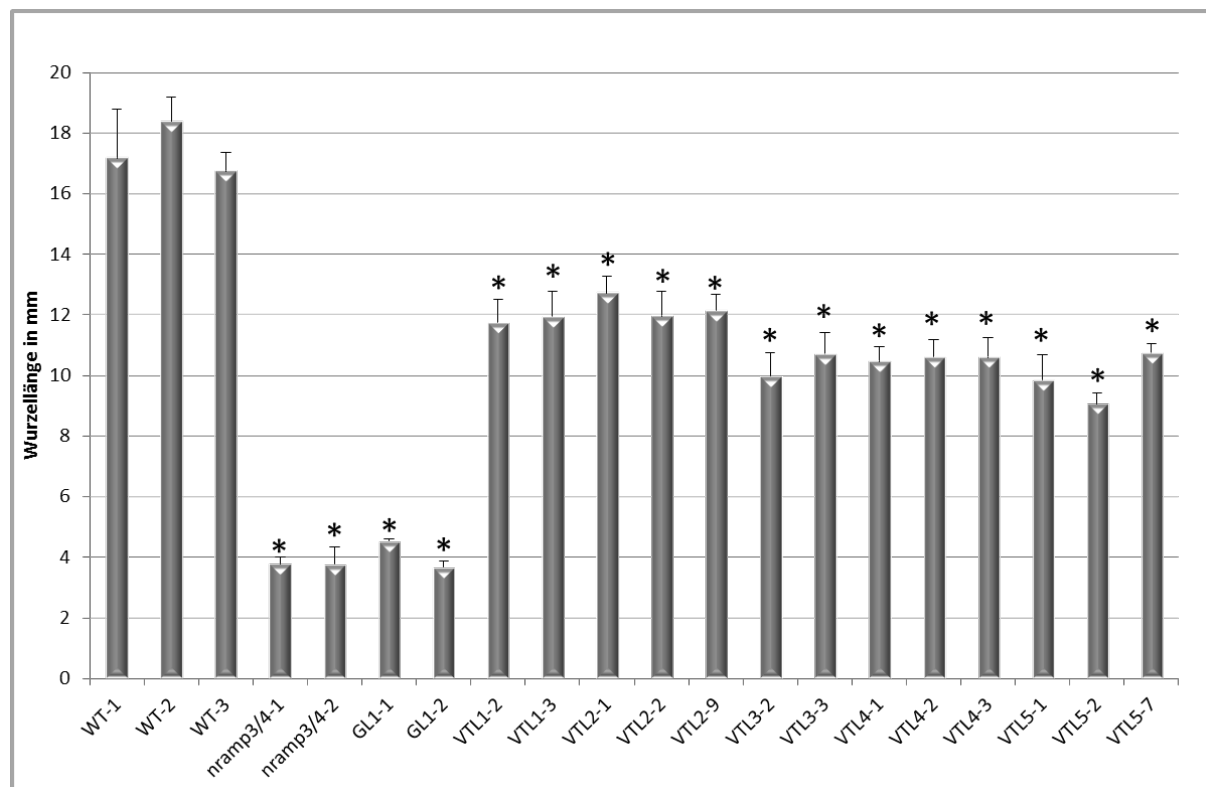


Abbildung 30: Messung und Vergleich der Wurzellängen der *nramp3/nramp4* Doppelmutante, des Wildtyps und der transgenen Linien (*nramp3/nramp4* + *VTL* Gen). Messung der Wurzellängen von fünf Tage alten Keimlingen (*nramp3/nramp4* Doppelmutante transformiert mit Leervektor (GL1) oder einem *VTL* Gen). Die *VTL* Gen überexprimierenden Linien besitzen signifikant längere Wurzeln als die Mutante. Die Keimlinge wurden auf ES Medium mit 0 μ M Eisen angezogen. Die Sternchen markieren einen signifikanten Unterschied zum Wildtyp ($p < 0,001$).

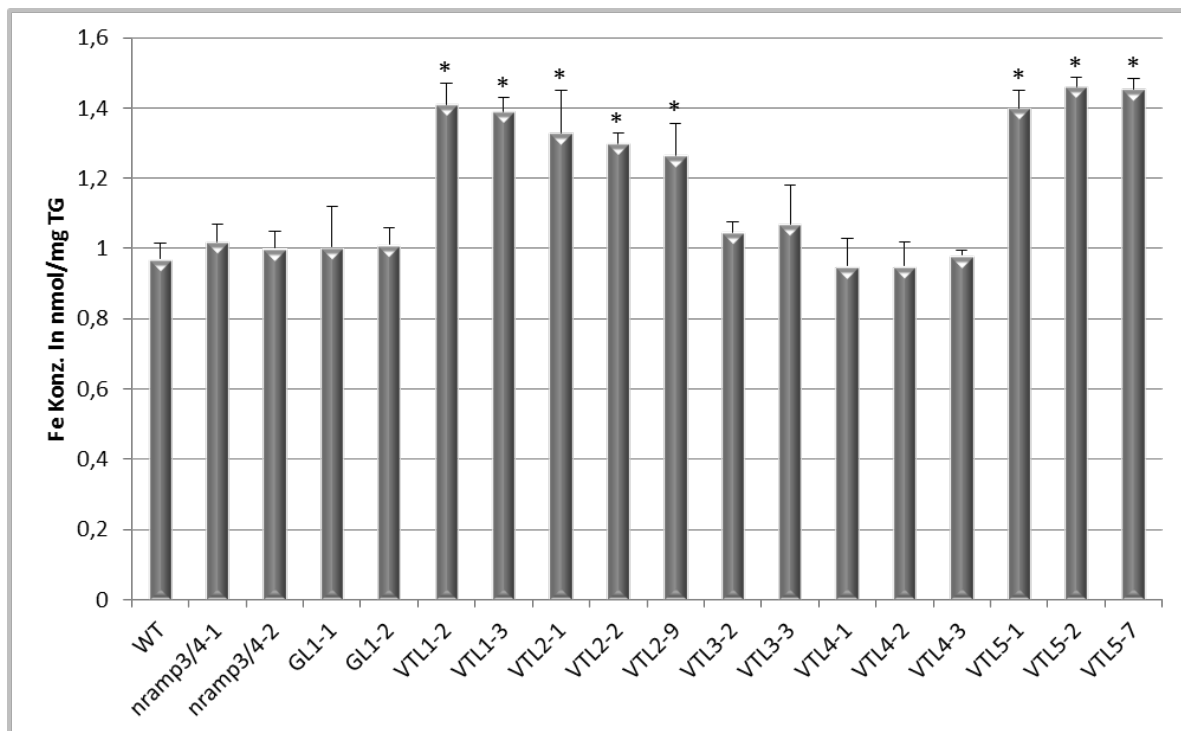


Abbildung 31: Messung der Eisenkonzentration in *Arabidopsis* Samen. Die Eisenkonzentration wurde in Wildtyp, *nramp3/4* Doppelmutanten- und Mutantensamen transformiert mit dem Leervektor (GL1) oder einem der *VTL* Gene, gemessen. Die *VTL1*, *VTL2* und *VTL5* überexprimierenden Linien besitzen einen signifikant erhöhten Eisengehalt in den Samen verglichen mit dem Wildtyp und der Mutante (*, $p < 0,05$).

3.7 *VTL knockout* Mutanten

Knockout Mutanten mit einem eindeutigen Phänotyp ermöglichen eine genauere Untersuchung der Funktion der zu untersuchenden Gene. Es gibt nur für *VTL 2-5* T-DNA Mutanten, von denen nur *VTL3* und 5 homozygot sind. Für *VTL1* konnte keine T-DNA Mutante identifiziert werden (uNASC). Bei den Untersuchungen der vorhandenen T-DNA Mutanten konnte kein offensichtlicher Phänotyp allgemein und in Abhängigkeit von der Eisernährung identifiziert werden. Die Keimlinge und Pflanzen unterscheiden sich weder in Wuchsform, Größe oder Färbung noch zeigen sie eine verzögerte Entwicklung gegenüber dem Wildtyp (Anhang Abb. A9).

3.7.1 Untersuchung der *vtl3* und *vtl5 knockout* Mutante

Im weiteren Ansatz wurde untersucht, ob sich der *knockout* von *VTL3* oder *VTL5* auf die Expression der anderen *VTL* Gene auswirkt. Dafür wurden die Pflanzen wie in 3.1 angezogen, geerntet, die RNA isoliert, cDNA synthetisiert und die Expression in den Wurzeln untersucht. Wenn *VTL3* oder *VTL5* nicht exprimiert werden, sind alle anderen *VTL* Gene trotzdem eindeutig detektierbar. Jedoch scheint sich das Expressionsmuster in Abhängigkeit von der Eisernährung zu verändern. Die Zunahme der Expression mit zunehmender Eisenkonzentration im Medium von *VTL1*, 2 und je nach Mutante 3 oder 5 ist weniger stark

ausgeprägt als im Wildtyp. *VTL1* zeigt in der *vtl3 knockout* Mutante noch eine eindeutige Zunahme von $-Fe$ zu $5 \mu M$ Eisen (Abb. 32a), was in der *vtl5 knockout* Mutante nicht zu sehen ist (Abb. 32b). Auch ist die Expressionszunahme aller *VTL*'s in der *vtl3* Mutante bei Eisenüberschuss ($120 \mu M$) nicht detektierbar (Abb. 32a).

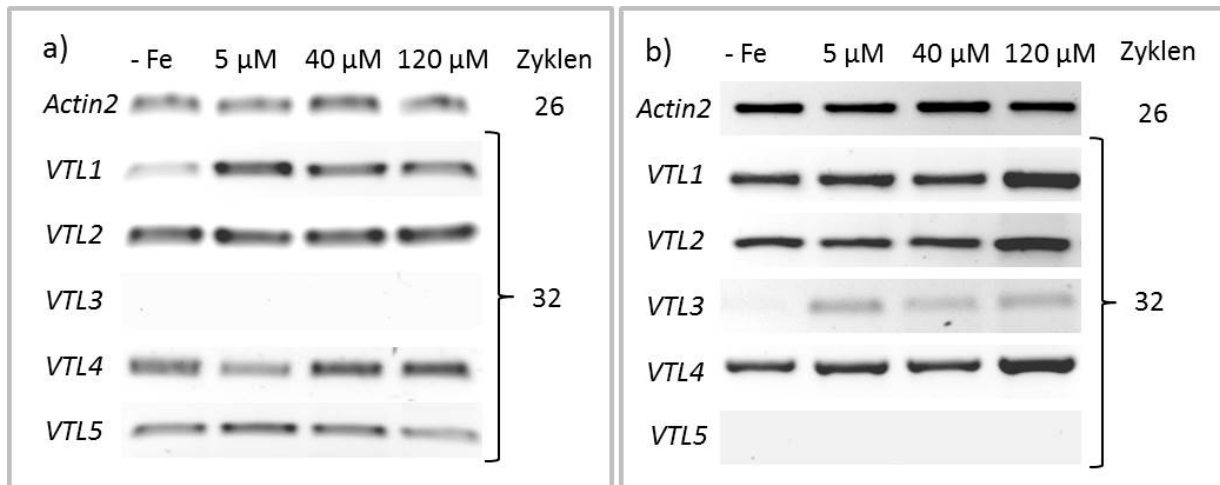


Abbildung 32: Semiquantitative PCR Analyse der *VTL* Gene in Abhängigkeit von der Eisernährung in der *vtl3* (a) oder der *vtl5* (b) *knockout* Mutante. Die Expression wurde in vier Wochen alten Pflanzen, die für 10 Tage auf dem entsprechenden Medium in Hydrokultur kultiviert wurden, analysiert. Die eisenabhängige Expression der jeweils verbleibenden *VTL* Gene ist in den Mutanten weniger stark ausgeprägt als im Wildtyp.

Drei der *VTL* Gene ursprünglich in einer Analyse der Kurzzeitantwort auf Eisenmangel identifiziert wurden und für *VIT1* ist bekannt, dass er fast ausschließlich im Embryo exprimiert wird. Beruhend darauf wurde die Expression der *VTL* Gene auch in vier Wochen alten Pflanzen, die nur 5–24 Stunden unter Eisenmangel bzw. Eisenüberschuss ($120 \mu M$) angezogen wurden und in Keimlingen mittels semiquantitativer PCR untersucht. Wie die ursprünglichen Microarray Daten (Buckhout et al. 2009), zeigt auch die PCR Analyse eine schnelle Expressionsabnahme unter Eisenmangel für *VTL1* und *VTL5* in Wildtyp Pflanzen. Für *VTL2* konnte in diesem Experiment im Wildtyp kein Unterschied zur Normalernährung detektiert werden, jedoch eine schwache Zunahme unter Eisenüberschuss in der *vtl5* Mutante und insgesamt eine schwache Expression in der *vtl3* Mutante. Auffällig ist auch, dass die Anpassung von *VTL1* in den beiden *knockout* Mutanten stärker ausgeprägt ist, als im Wildtyp. Die Expression von *VTL3* wirkt in der *vtl5* Mutante leicht erhöht gegenüber dem Wildtyp. Im Gegensatz zu den bisher erhaltenen Daten kann für *VTL4* eine eindeutige eisenabhängige Expressionszunahme in den beiden Mutanten detektiert werden, allerdings nur unter Überschussbedingungen (Abb. 33). Die Untersuchung der Expression in fünf Tage alten Keimlingen, die unter verschiedener Eisenfütterung in Flüssigkultur (ES Medium +/- $x \mu M$ Fe) angezogen wurden, zeigte weiterhin eine eindeutige eisenabhängige Anpassung der Expression von *VTL2* und *VTL3* im Wildtyp und für *VTL3* in der *vtl5* Mutante. Interessant ist

jedoch, dass die Expression von *VTL2* im *vtl3* Hintergrund gleichbleibend gering ist und zwar ungefähr auf dem Level von 0 μM Eisen beim Wildtyp. Die Expressionsänderung aufgrund von Eisen von *VTL1* ist in allen drei Linien in den Keimlingen schwächer ausgeprägt, als in adulten Pflanzen. Für *VTL4* kann weiterhin keine Anpassung detektiert werden. Überraschenderweise zeigt *VTL5* in Keimlingen auch keine ernährungsbedingte Anpassung der Expression (Abb. 34).

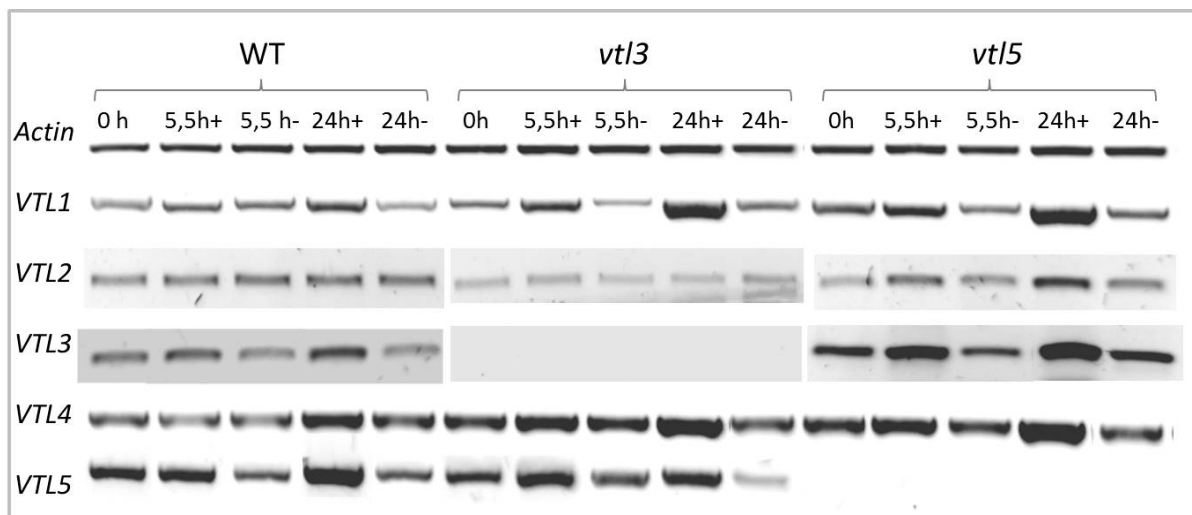


Abbildung 33: Semi-quantitative PCR Analyse der Kurzzeitantwort der *VTL* Gene auf Eisen in Wildtyp, *vtl3* und *vtl5* Pflanzenwurzeln. Vier Wochen alte Pflanzen wurden in Hydrokultur (- = 0 μM Eisen, + = 120 μM Eisen) für 5 – 24 h kultiviert. Anschließend wurde die RNA der Wurzeln isoliert und cDNA synthetisiert. *VTL1* und *VTL5* zeigt eine Kurzzeitantwort in allen Linien. Für *VTL2* kann keine eisenbedingte Expression im Wildtyp und insgesamt eine schwache Expression in der *vtl3* Mutante detektiert werden. Die Expression von *VTL3* ist in der *vtl5* Mutante gegenüber dem Wildtyp erhöht und *VTL4* zeigt unter Eisenüberschuss eine Expressionserhöhung in allen Linien.

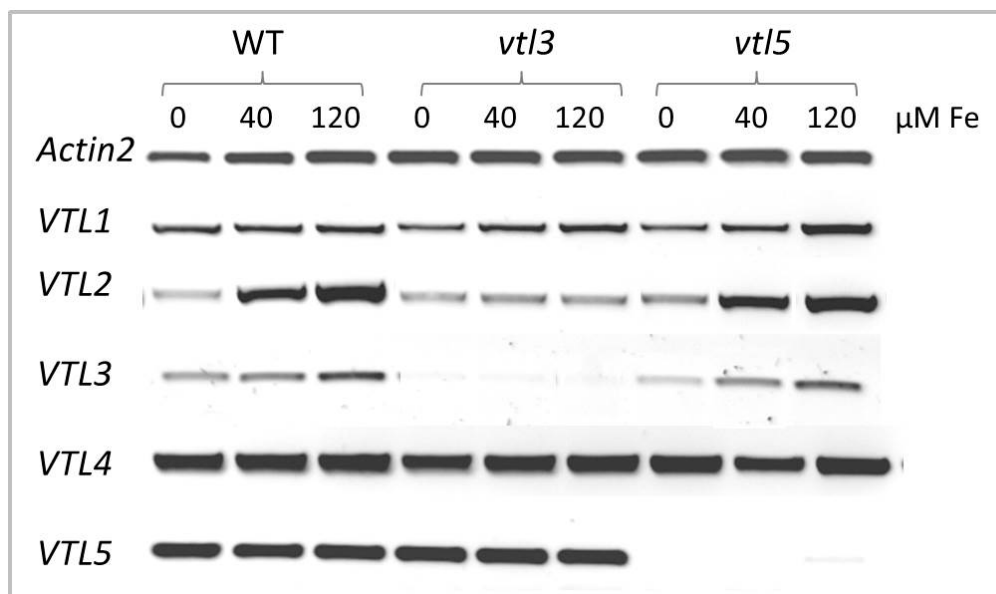


Abbildung 34: Semi-quantitative PCR Analyse von fünf Tage alten WT, *vtl3* und *vtl5* Keimlingen. Anzucht in Flüssigkultur (ES Medium mit verschiedener Eisenkonzentration) unter Kurztagbedingungen. Die eisenabhängige Expressionsänderung von *VTL1* ist in den Keimlingen in allen drei Linien schwächer ausgeprägt, als in adulten Pflanzen. Die Expression von *VTL2* ist in der *vtl3* Mutante auffällig schwach. *VTL4* und interessanterweise auch *VTL5* werden konstant exprimiert.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde der Gesamteisengehalt von Spross und Wurzel in Abhängigkeit von der Eisenernährung der *vtl3* und *vtl5* Mutante untersucht und mit dem Wildtyp verglichen. Dafür wurden vier Wochen alte Pflanzen für 10 Tage unter verschiedener Eisenfütterung in Hydrokultur angezogen, Spross und Wurzel geerntet und der Gesamteisengehalt bestimmt. Unter Eisenmangel bzw. Normalernährung konnte kein Unterschied im Eisengehalt gegenüber dem Wildtyp gemessen werden. Bei einer Eisen-Überschuss Ernährung kommt es jedoch zu einer signifikanten Erhöhung im Spross in der *vtl3* Mutante und einer Verringerung in der Wurzel in der *vtl3* und *vtl5* Mutante, verglichen mit dem Wildtyp (Abb. 35) (Gollhofer et al. 2011). Daraufhin wurde die Aktivität der Fe^{3+} Chelatreduktase (FRO2) in beiden Mutanten gemessen, es konnte jedoch kein Unterschied zum Wildtyp detektiert werden (Abb. A10). Zusammenfassend geben die Ergebnisse keinen klaren Aufschluss über die Funktion von VTL3 und VTL5, sie unterstützen aber die Vermutung, dass zumindest VTL3 und VTL5 eine Rolle bei der Regulation der Eisenhomöostase spielen und eventuell in die Regulation der Eisenverteilung innerhalb der Pflanze integriert sind. Außerdem erscheint eine Regulation der *VTL* Gene untereinander möglich. Die gleiche Untersuchung der heterozygoten Mutanten ergab keine signifikanten Unterschiede (Abb. A11).

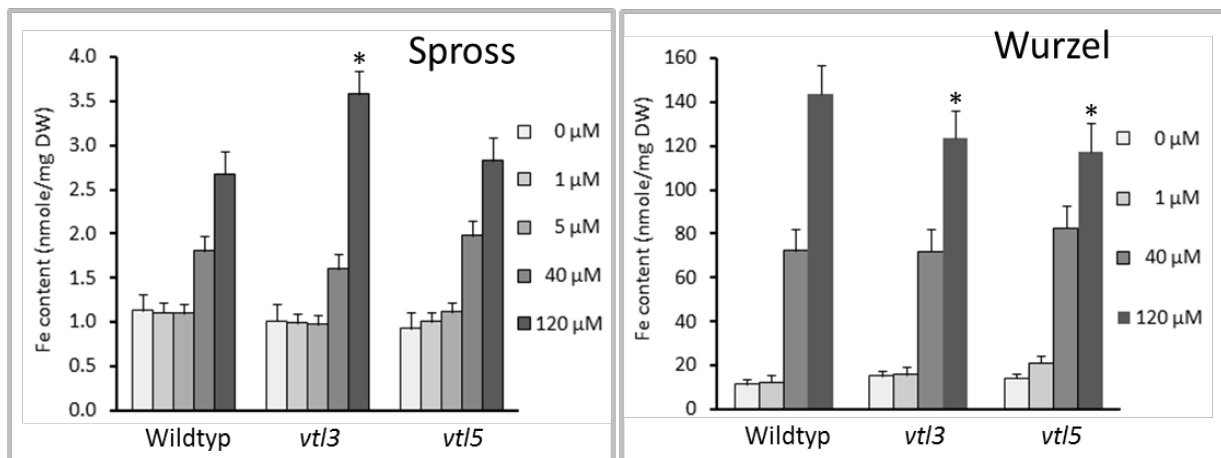


Abbildung 35: Messung der Eisenkonzentration in Spross und Wurzel der *vtl3* und *vtl5* knockout Mutante in Abhängigkeit von der Eisenernährung. Vier Wochen alte *Arabidopsis* Pflanzen wurden für 10 Tage in Hydrokultur mit verschiedener Eisenkonzentration kultiviert. Der Spross der *vtl3* Mutante besitzt einen signifikant höheren bzw. die Wurzeln der *vtl3* und *vtl5* Mutante einen signifikant geringeren Eisengehalt als der Wildtyp (*, $p < 0,05$) (Messung durchgeführt von Christin Schläwicke, innerhalb der Arbeitsgruppe).

3.7.2 Herstellung einer *vtl1* knockout Mutante

Um eine *vtl1* Mutanten Linie herzustellen, wurde zum einen probiert, eine *antisense* Linie und zum anderen eine RNAi Linie zu erzeugen. Mit beiden Ansätzen ist es nicht gelungen eine homozygote *vtl1* Mutante herzustellen. Eine Untersuchung der Schoten aus der T1 Generation der RNAi Linie (Wildtyp Pflanzen transformiert mit dem RNAi Konstrukt) zeigt jedoch, dass es zu einem letalen Effekt kommt. Innerhalb einer Schote der transformierten Pflanzen bilden signifikant mehr Samenanlagen keinen Samen aus, als in Vergleichsschoten vom Wildtyp oder Wildtyppflanzen transformiert mit einem Kontrollkonstrukt (VTL1-mCherry) (Abb. 33). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass ein *knockout* von *VTL1* embryolethal wirkt, wodurch sich auch erklären lässt, dass man keine T-DNA Mutante erhalten kann.



Abbildung 36: Vergleich der Samenanlagen in Schoten von Wildtyp Pflanzen, Wildtyppflanzen transformiert mit VTL1-mCherry (Kontrollkonstrukt) oder VTL1-RNAi. VTL1-RNAi zeigt verkümmerte Samenanlagen → Transformation wirkt embryolethal.

4. Diskussion

Ergebnis dieser Arbeit ist die Identifizierung und Charakterisierung einer kleinen Familie von fünf VIT-like-Transporter (Vacuolar iron Transporter Like) (*VTL*) Genen in *Arabidopsis thaliana*, denen eine Funktion im Eisentransport zugeschrieben wird.

Eine erhöhte Konzentration von freiem Eisen (Fe^{2+}) innerhalb der Zelle ist aufgrund seiner Reaktivität mit Sauerstoff und den daraus resultierenden Hydroxylradikalen, toxisch (Kehrer, 2000; Halliwell & Gutteridge, 1990). Gleichzeitig ist Eisen ein essentieller Nährstoff, der trotz seiner hohen Konzentration in der Erdkruste schwer verfügbar ist, weswegen es häufig zu Mangelercheinungen bei den höheren Lebewesen kommt (Vose, 1982). Innerhalb der Nahrungskette sind Pflanzen die einzige Eisenquelle für Tiere und Menschen, so dass es für die Weltbevölkerung von großem Interesse ist, die verfügbare Eisenkonzentration, speziell von Kulturpflanzen, zu erhöhen, was gleichzeitig zur Ertragssteigerung dieser führt. Höhere Pflanzen haben spezielle Mechanismen entwickelt, um einerseits die Eisenaufnahme zu erhöhen und andererseits durch gezielten Transport und Speicherung eine toxische Zellkonzentration zu vermeiden (Römheld & Marschner, 1986). Die vollständige Identifizierung und Aufklärung, der an der Eisenhomöostase beteiligten Mechanismen, würde eine gezielt molekulare Züchtung ermöglichen, die die Eiseneffizienz erhöht.

4.1 Eisenabhängige Expression, phylogenetische Einordnung und Sequenzanalyse der *VTL* Gene

Durchgehend konsistent zeigten mehrere Ergebnisse in dieser Arbeit (Abb. 8, 11, 13 und 14), dass vier der fünf *VTL* Gene (*VTL1-3* und *VTL5*) eisenabhängig exprimiert werden. Unter Eisenmangel kommt es zu einer schnellen Verminderung der Expression in den Wurzeln von vier Wochen alten Pflanzen und in Keimlingen. Die Ergebnisse für *VTL1*, 2 und 5 sind deckungsgleich mit Ergebnissen vorangegangener Arbeiten (Yang et al. 2010; Buckhout et al. 2009; Dinnyen et al. 2008). García et al. zeigt jedoch eine Expressionszunahme für *VTL1*, 2 und 5 unter Eisenmangel in den Wurzeln (García et al. 2010). Innerhalb dieser Arbeit konnte keine offensichtliche Erklärung für diese Diskrepanz genannt werden. Jedoch erscheint die Regulation der *VTL* Gene, wie die gesamte Regulation der Eisenhomöostase, sehr komplex, so dass verschiedene Versuchsbedingungen (Dauer des Eisenmangels, Alter der Pflanzen usw.) eine mögliche Ursache darstellen können.

Die Verwandtschaftsanalyse der *VTL* Gene innerhalb von *Arabidopsis* zeigt, dass sie untereinander sehr ähnlich sind (61–88 % Homologie) und eine 30 %ige Homologie zu VIT1

(Abb. 5), einem an der Vakuole lokalisiertem Eisen und Mangan Transporter (Kim et al. 2006 b), besitzen. Die Analyse der AS-Sequenz und der putativen Sekundärstruktur zeigt, dass alle VTL-Proteine, wie VIT1, fünf Transmembrandomänen und eine CCC1-like Domäne aufweisen (Abb. 9). Proteine mit einer CCC1-like Domäne sind weit verbreitet in Pflanzen. Die phylogenetische Einordnung der *VTL* Gene zeigt daher auch eine relativ nahe Verwandtschaft zu Genen in Reis, Mais, Moosen, Pappel, Rhizinus und *Chlamydomonas* (Abb. 6). Die beiden aufgeführten Gene aus *Chlamydomonas* kodieren für putative an der Vakuolenmembran lokalisierte Transporter, die die Eisenaufnahme in die Vakuole katalysieren (Urzica et al. 2012). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen dieser Proteine mit den VTL-Proteinen, weist eine Sequenzhomologie von 37–38 % auf (Abb. 7). Basierend auf diesen Ergebnissen, wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, dass es sich, wie in anderen Organismen auch, bei AtVIT1 „nur“ um einen von mehreren CCC1-like Transportern in *Arabidopsis* handelt und dass zumindest einige der *VTL* Gene eine homologe Funktion übernehmen.

4.2 Eisentransportaktivität der VTL Proteine

4.2.1 Komplementation der $\Delta ccc1$ Hefemutante

In Bezug auf die Eisenaufnahme gehört *Arabidopsis thaliana* zu den Strategie-I-Pflanzen. Jedoch speichert sie, wie Hefen und *Chlamydomonas reinhardtii*, im Unterschied zu vielen anderen höheren Pflanzen, das meiste Eisen in der Vakuole, statt an Ferritin gebunden in den Chloroplasten (Lanquar et al. 2010). Bis heute wurden für *Arabidopsis* vier Proteine (VIT1, FPN2, Nramp3 und Nramp4) identifiziert, die eine vakuoläre Eisentransportaktivität besitzen. Während Nramp3 und Nramp4 redundant zueinander sind und Eisen während der Keimung aus der Vakuole mobilisieren (Lanquar et al. 2005), konnte für VIT1 ein Import gezeigt werden (Kim et al. 2006 b). FPN2 transportiert vorwiegend Cobalt in die Vakuole, es konnte aber auch eine Transportaktivität für Fe^{2+} Ionen gezeigt werden (Morrissey et al. 2009). VIT1 hat eine 62 %ige Sequenzähnlichkeit zu dem aus Hefen bekannten vakuolären Eisen und Mangan Transporter CCC1p und ist in der Lage, den Mutanten-Phänotyp der $\Delta ccc1$ *knockout* Mutante, ebenso wie mehrere VIT Homologe aus anderen Spezies (*OsVIT1*, *OsVIT2* und *TgVIT1*), zu komplementieren (Zhang et al. 2012; Momonoi et al. 2009; Kim et al. 2006 b). Die $\Delta ccc1$ *knockout* Mutante ist hypersensitiv gegenüber erhöhten extrazellulären Eisenkonzentrationen, so dass sie nicht in der Lage ist, auf Medien mit mehr als 3 mM FeSO_4 zu wachsen (Li et al. 2001). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die heterologe Expression von *VTL1-5* in $\Delta ccc1$ Zellen auch den Mutanten-Phänotyp komplementieren kann

(Abb. 15). Dadurch erscheint eine Eisentransportaktivität der VTL Proteine sehr wahrscheinlich.

4.2.2 Komplementation der *vit1-1* und *nramp3/nramp4* Doppelmutante

Die vermutete Funktion von VTL1-5 als Eisentransporter wird durch die Fähigkeit der einzelnen Gene, sowohl den Phänotyp der *nramp3/nramp4* Doppelmutante, wie auch der *vit1-1* Mutante zu komplementieren, unterstützt (Abb. 26, 27, 29, 30). Wie oben beschrieben, handelt es sich bei Nramp3 und Nramp4 um zwei redundant wirkende Eisen- und Mangantransporter, die den Eisenexport aus der Vakuole während der Keimung katalysieren. Die Doppelmutante zeigt ein verzögertes Wurzelwachstum und chlorotische Kotyledonen in den ersten Tagen der Keimung, wenn sie unter Eisenmangel angezogen wird, da nicht ausreichendes Eisen aus der Vakuole mobilisiert werden kann (Lanquar et al. 2005). Der Phänotyp verschwindet mit zunehmendem Wachstum, bzw. tritt nicht auf, wenn dem Medium Eisen zugesetzt oder eines der *VTL* Gene in der Mutante überexprimiert wird (Abb. 30). Die Messung der totalen Eisenkonzentration von Samen der *nramp3/nramp4* Doppelmutante, die *VTL1*, 2, 3, 4 oder 5 überexprimieren, zeigte, dass die Überexpression von *VTL1*, *VTL2* oder *VTL5* zu einer signifikanten Erhöhung des Eisengehalts verglichen mit den Mutanten- und Wildtypsamens, führt (Abb. 31). Dies lässt vermuten, dass die Erhöhung der Eisenkonzentration, vorzugsweise in der Vakuole, ausreicht den mangelnden Efflux zu kompensieren. Die Tatsache, dass VTL3 und VTL4 auch den Phänotyp komplementieren, jedoch keine erhöhte Eisenkonzentration in den Samen detektiert werden konnte, lässt sich schwerer erklären. Ein möglicher Erklärungsansatz liegt nicht allein in dem erhöhten Eisengehalt, sondern eventuell auch in einer veränderten Lokalisation des Eisens. Bis heute konnten dahingehende Versuche jedoch keine veränderte Lokalisation zwischen Wildtyp und Mutante aufzeigen (Popescu, 2014; Roschztardt et al. 2013).

Auch der Mutanten-Phänotyp der *vit1-1* Mutante, der in dieser Arbeit ebenfalls durch ein vermindertes Wurzelwachstum und chlorotische Kotyledonen bei Keimung auf Eisen-defizientem Medium gekennzeichnet war, wurde durch die Überexpression der einzelnen *VTL* Gene komplementiert (Abb. 27). Der Phänotyp beruht auf einer veränderten, eher diffusen, Verteilung des Eisens innerhalb des Embryos, wobei die Gesamteisenkonzentration im Samen unverändert bleibt (Kim et al. 2006 b). Was genau die Grundlage des Komplementationseffekts ist, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Es wurde die Verteilung des Eisens in Embryonen von Wildtyp- Mutanten- und transgenen Mutantenpflanzen mittels *Perls Staining* untersucht. Die eher diffuse Eisenverteilung in der Mutante gegenüber dem Wildtyp konnte bestätigt werden. Jedoch zeigten die transgenen

Embryonen auch den Mutanten-Phänotyp (Abb. 28). In einem weiteren Ansatz wurde die Gesamteisenkonzentration der transgenen Samen gemessen, um zu untersuchen, ob die Überexpression der *VTL* Gene, wie bei der *nramp3/4* Doppelmutante, diese erhöht. Es konnte jedoch in keiner transgenen Linie ein Unterschied zum Wildtyp und zur Mutante gemessen werden (Abb. A8).

Da die *VTL* Gene in der Lage sind, sowohl die Funktion von einem vakuolären Eisenimporter, wie auch von zwei vakuolären Eisen-Efflux-Carriern zu komplementieren erscheint widersprüchlich und dient als Beispiel dafür, wie komplex die Eisenregulation in Pflanzen ist. Von daher bedarf es einer genauen Aufklärung der Grundlage des Komplementationeffektes, sowohl von der *nramp4/nramp4* Doppelmutante, wie auch von der *vit1-1* Mutante, wobei ein erster Schritt die Untersuchung der intrazellulären Lokalisation der *VTL* Gene darstellt. Nichtsdestotrotz beweisen die Ergebnisse, dass die *VTL* Gene in Pflanzen *in vivo* eine Eisentransportaktivität besitzen.

4.3 Intrazelluläre Lokalisation der VTL Transporter

4.3.1 Lokalisation der Eisentransporter VTL1, 2 und 5 an der Vakuolenmembran

Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass die vakuoläre Eisenkonzentration von $\Delta ccc1$ Zellen, die *VTL1*, 2 oder 5 heterolog exprimieren, signifikant erhöht ist gegenüber den Kontrollzellen (Abb. 18a). Diese Ergebnisse und die Tatsache, dass ein eindeutiges His-Antikörper-Signal mit der Vakuolenfraktion des Ficoll Gradientens und einer erhöhten Eisenkonzentration im Gradienten korreliert, wenn *VTL1-His* oder *VTL2-His* heterolog exprimierende $\Delta ccc1$ Zellen verwendet wurden (Abb. 18b), spricht dafür, dass VTL1, VTL2 und VTL5 den Eisentransport in die Vakuole katalysieren und so die zytoplasmatische Eisenkonzentration regulieren. Unterstützt wird diese Behauptung für VTL1 zusätzlich durch die Lokalisationsergebnisse von mCherry-VTL1 in Blattzellen von *Arabidopsis* und Tabak (Abb. 19, 20) und für *VTL1* und *VTL2* durch die Ergebnisse von GFP-VTL1 und GFP-VTL2 in Zwiebelepidermiszellen (Gollhofer et al. 2014). In beiden Versuchen konnte für VTL1 eine eindeutige Lokalisation im Tonoplasten gezeigt werden. Das Signal war deckungsgleich mit dem Signal des jeweiligen Vakuolen-Markers. Das GFP-Signal von GFP-VTL2 ließ sich auch im Tonoplasten detektieren, zusätzlich fand man aber auch ein Signal in der Plasmamembran und im Zytosol.

4.3.2 Mögliche Lokalisation der Eisentransporter VTL3 und VTL4 an der Plasmamembran

Für *VTL3* und *VTL4* heterolog exprimierende $\Delta ccc1$ Zellen konnte gezeigt werden, dass sich die vakuoläre Eisenkonzentration nicht von den Kontrollzellen unterscheidet (Abb. 18a), trotzdem liegt ein Komplementationseffekt der $\Delta ccc1$ Mutante vor (Abb. 15), was annehmen lässt, dass sie in einer anderen Art und Weise die Eisenkonzentration im Zytosol senken können. Naheliegend ist, dass sie entweder das Eisen in ein anderes Zellkompartiment oder gänzlich aus der Zelle heraus transportieren.

Die Messung der Gesamteisenkonzentration von *VTL3* und *VTL4* heterolog exprimierenden $\Delta ccc1$ Zellen, zeigte, dass die Zellen einen geringeren Eisengehalt aufweisen als die Kontrollzellen (Abb. 23 und 24). Daraus kann man die Vermutung aufstellen, dass VTL3 und VTL4 an der Plasmamembran lokalisiert sind und Eisen aus der Zelle exportieren. Diese Ergebnisse werden unterstützt durch die Lokalisationsergebnisse von mCherry-VTL4, angefertigt von Weiqiong Li in ihrer Masterarbeit (innerhalb der Arbeitsgruppe). Für mCherry-VTL4 konnte eine Lokalisation in der Plasmamembran in transient transformierten Zellen von Tabakblättern gezeigt werden. Das mCherry-Signal ist deckungsgleich mit dem YFP-Signal des Plasmamembranmarkers und trennbar von dem YFP-Signal des Tonoplast-Markers (Abb. 21, 22). Denkbar erscheint ein Eisenexport entlang der Transportwege des Eisens innerhalb der Pflanze. Also z.B. aus den Rhizodermiszellen über Parenchym- und Xylemparenchymzellen zum Xylem ähnlich der Funktionsweise von FPN1. FPN1 wird im Perizykel exprimiert und transportiert Eisen und Cobalt aus dem Perizykel ins Xylem (Morrissey et al. 2009). Diese Vermutung könnte auch eine Erklärungsgrundlage für die Komplementation der *nramp3/nramp4* Mutante durch VTL3 und VTL4 liefern. Wenn VTL3 und VTL4, analog zu FPN1, Eisen ins Xylem transportieren und dabei eventuell bevorzugt im Embryo bzw. Keimling aktiv sind, ist es vorstellbar, dass ein verstärkter (bis jetzt nicht detektierbarer) Transport in die Leitgewebe für eine bessere Eisenversorgung der Keimwurzel und Keimblätter sorgt und so die Komplementation erreicht wird. Um jedoch die Idee, dass VTL3 und VTL4 Plasmamembran lokalisierte Eisen-Efflux-Carrier sind, zu untermauern, müssen noch mehr Ergebnisse erbracht werden. Die Lokalisation von VTL3 in Pflanzenzellen wäre ein erster Schritt, ebenso wie die zellspezifische Expression von *VTL3* und *VTL4* in Pflanzen. Aussagekräftig wäre auch der Nachweis der Transportaktivität der rekombinanten Proteine in vivo, z.B. durch Komplementation der *nramp3/nramp4* und *vit1-1* Mutante.

4.4 Untersuchung der gewebespezifischen Expression der *VTL* Gene

Eine mögliche Ursache für das Vorhandensein von mehreren Transportern mit augenscheinlich gleicher Funktion kann darin liegen, dass die Transporter in verschiedenen Geweben, verschiedenen Entwicklungsstadien und/oder unter verschiedenen Anzuchtbedingungen aktiv sind.

4.4.1 Gewebespezifische Expressionsanalyse mittel Promotor-GUS Fusionskonstrukten

Die Promotoraktivität von *VTL1* und *VTL5* wurde mittels Promotor-GUS Fusionskonstrukten in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen untersucht. Unter der Kontrolle des *VTL1* Promotors konnte ein GUS-Signal entlang des Gefäßleitsystems im gesamten Keimling und Filament, wie auch im Embryo und in den Samen gezeigt werden (Abb. 10). Dieses Ergebnis entspricht den Expressionsanalysen, die man von Fusionskonstrukten mit dem Promotor von *VIT1* erhalten hat (Kim et al. 2006 b). Dagegen war das GUS-Signal unter der Kontrolle des *VTL5* Promotors im Keimling zwar deutlich entlang des Gefäßleitsystems, aber nur in der Wurzel detektierbar. In den Samenanlagen konnte kein Signal und im Embryo nur ein sehr schwaches Signal gefunden werden (Abb. 10a). Jedoch konnte eine GUS-Aktivität im Filament, dem Konnektiv und den Pollenkörnern von *VTL5::GUS* transgenen Pflanzen, nachgewiesen werden (Abb. 10b). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die einzelnen *VTL* Transporter wahrscheinlich in verschiedenen Geweben bevorzugt aktiv sind.

4.4.2 Gewebespezifische Expression - *Genevestigator* Daten

Eine erhöhte Expression von *VTL1* und *VTL5* in der Wurzel wurde schon von Rampey et al. 2006 gezeigt. Aktuelle *Genevestigator* Daten (www.genevestigator.com; Zimmermann et al. 2004) zeigen eine genauere Aufschlüsselung der gewebespezifischen Expression der *VTL* Gene. Für *VTL1* wird eine erhöhte Expression allgemein im leitenden Gewebe (Stele), in Wurzelzellen und im Samen bzw. Embryo gezeigt, was die in dieser Arbeit erhalten GUS Daten unterstützt. Laut *Genevestigator* Daten kann die Expression in der Stele vorrangig im Xylem detektiert werden, womit sich erklären lässt, dass auch in anderen Xylem enthaltenden Pflanzenorganen (Blattstiel, Knoten, Keimwurzel) ein erhöhtes Signal nachgewiesen werden kann. Die stärkste Expression kann jedoch im Embryo und Samen gefunden werden (Abb. 38). *VTL2* wird dagegen bevorzugt allgemein im Spross und leitendem Gewebe (eher Phloem) exprimiert. *VTL3* und *VTL4* werden durchgehend eher schwach exprimiert. Für *VTL3* kann eine leichte Expressionserhöhung in Blattzellen und im Embryonalgewebe detektiert werden. *VTL4* wird dagegen nur im Suspensor exprimiert. Dies widerspricht den in dieser Arbeit erhaltenen Daten der semiquantitativen PCR, da hier eine durchgehende Expression sowohl in

den Wurzeln von adulten Pflanzen, als auch im Keimling gezeigt werden konnte. Da die zugrunde liegende Probenanzahl der *Genevestigator* Daten, mit zwei Pflanzen, sehr gering ist, wird dieses Ergebnis in dieser Arbeit nicht weiter interpretiert. Für *VTL5* wird, übereinstimmend mit den GUS Daten aus dieser Arbeit, vorwiegend eine Expression in der Wurzel (Keimwurzel, Primärwurzel, Lateralwurzeln) detektiert. Die GUS Expression im Filament und den Pollenkörnern lässt sich durch die *Genevestigator* Daten jedoch nicht bestätigen (Abb. 38). Insgesamt muss bei der Nutzung der *Genevestigator* Daten aber bedacht werden, dass die Abhängigkeit der Expression von der circadianen Uhr bei der Auswertung nicht berücksichtigt wurde. Trotzdem unterstützen im Großen die *Genevestigator* Daten die Vermutung, dass die *VTL* Gene ähnliche Funktionen in unterschiedlichen Geweben übernehmen. Die Tatsache, dass *VIT1* hauptsächlich im Embryo aktiv ist (Abb. 37; Kim et al. 2006 b), stützt die Annahme, dass weitere Transporter vorhanden sein müssen.

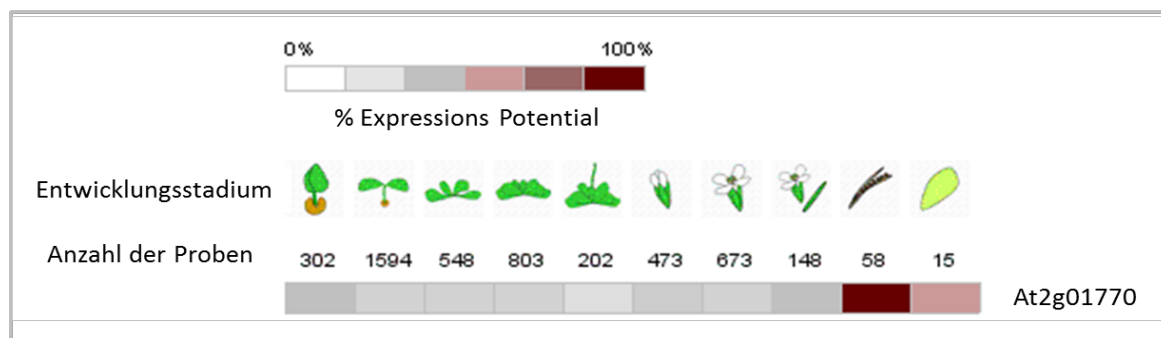
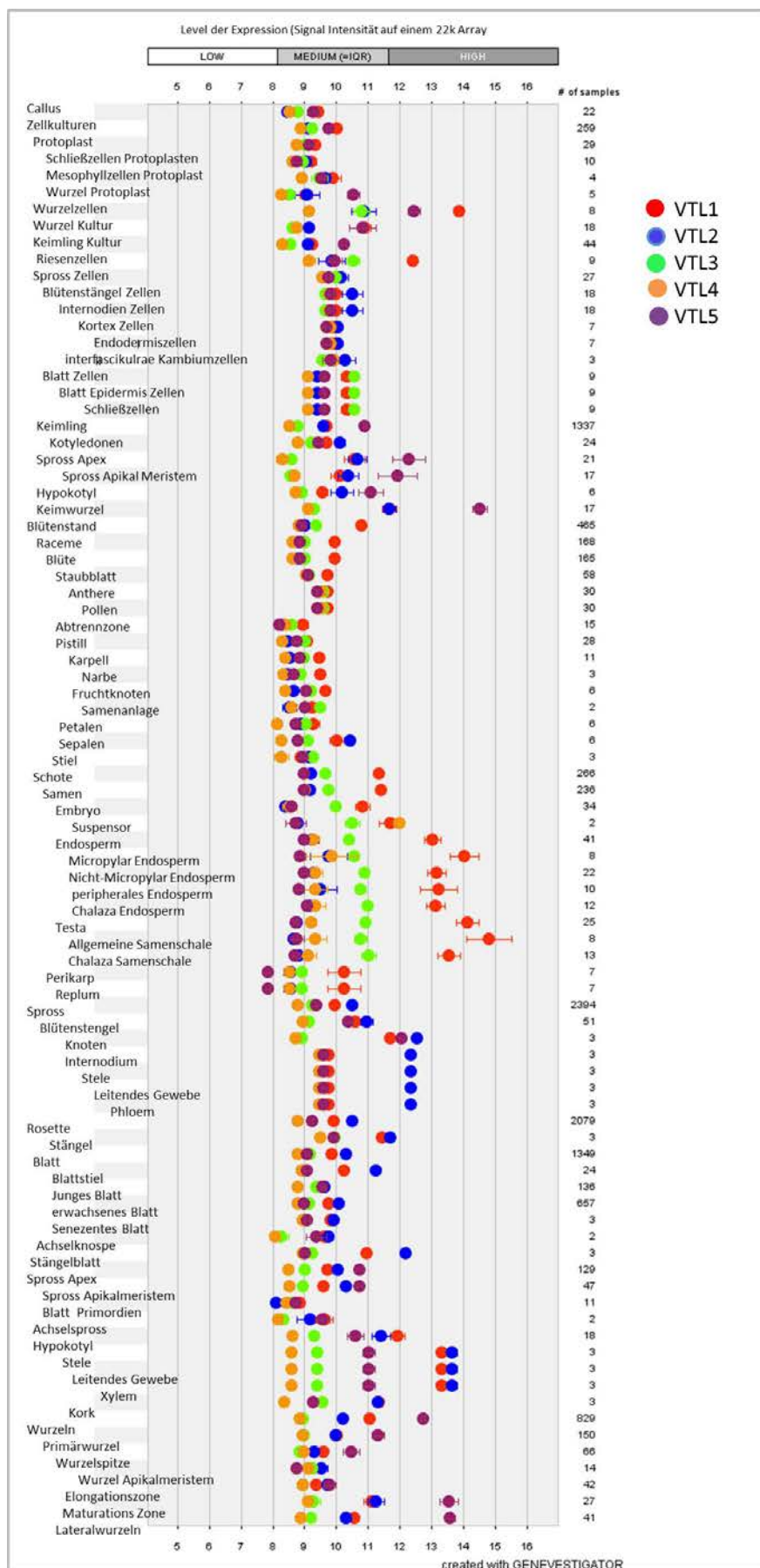


Abbildung 37: Entwicklungsstadium abhängige Expression von *VIT1*. *VIT1* wird bevorzugt in den Samenanlagen bzw. dem Embryo exprimiert. Daten erhalten von Genevestigator (www.genevestigator.com).

Abbildung 38: Genevestigator Daten. Gewebespezifische Expression der *VTL* Gene.

4.5 Substratspezifität der VTL Transporter

Für viele Kationen Transporter aus Pflanzen und Hefen ist es bekannt, dass sie nicht nur den Transport von einem, sondern von mehreren Ionen katalysieren können. Zum Beispiel ist die Substratspezifität von IRT1 relativ gering, obwohl seine Aktivität essentiell ist für die Eisenaufnahme der Pflanze. Bei Abwesenheit von Eisen oder Überschuss von anderen Kationen katalysiert er auch den Transport von Zink, Mangan und Cadmium (Cohen et al. 1998; Vert et al. 2002). Als Folge kommt es unter Eisenmangel zu einer Akkumulation von Zink in der Wurzel (Vert et al. 2002; Sinclair & Krämer, 2012). Auch für AtVIT1 und die Orthologe aus anderen Spezies wurde neben Eisen eine Transportaktivität für Zink und Mangan gezeigt. OsVIT1 und OsVIT2 sind in der Lage, die $\Delta ccc1$ und $\Delta zrc1$ Hefemutante zu komplementieren. Ihre heterologe Expression innerhalb der $\Delta ccc1$ Mutante erhöht die vakuoläre Eisen- und Mangankonzentration, ebenso wie die Zinkkonzentration in der $\Delta zrc1$ Mutante. OsVIT1 und OsVIT2 werden hauptsächlich im Fahnenblatt und Schaft exprimiert. Die T-DNA Mutanten (*osvit1-1* und *osvit2-1*) zeigen folglich eine verminderte Eisen und Zinkkonzentration im Fahnenblatt, jedoch keine Veränderung in der Mangankonzentration. Es konnte gezeigt werden, dass OsVIT1 und OsVIT2 die Verteilung von Eisen und Zink zwischen den Source- und Sink-Geweben regulieren, wobei interessanterweise nur OsVIT2 über die Eisenkonzentration reguliert wird (Zhang et al. 2012). AtVIT1 und CCC1p transportieren neben Eisen auch Mangan in die Vakuole. Der *knockout* von CCC1 führt zu einer reduzierten Konzentration von Eisen und Mangan in der Vakuole und zu einer Hypersensitivität gegenüber einer erhöhten Eisenkonzentration im Medium (Li et al. 2001). Die Überexpression von VIT1 in der $\Delta ccc1$ Mutante komplementiert den Phänotyp und erhöht signifikant die Eisen- und Mangankonzentration in der Vakuole (Kim et al. 2006 b). Auch für Nramp3 und Nramp4 konnte eine Mangan-Transport-Aktivität gezeigt werden, ihre Expression wird jedoch ausschließlich von dem Eisenstatus bestimmt. Es wird vermutet, dass sie möglicherweise eine Funktion bei dem Transport von Mangan von der Vakuole zu den Plastiden in Mesophyllzellen haben (Lanquar et al. 2010). Außerdem wurden in *Arabidopsis* fünf Zink Transporter gefunden, deren Expression eisenabhängig reguliert ist. Vier dieser Vertreter transportieren Zink in die Vakuole und sind unter Eisenmangel induziert. Der fünfte Vertreter, AtZIP3, wurde als Zink Transporter, lokalisiert in der Plasmamembran, identifiziert. Seine Expression ist unter Eisenmangel reprimiert (Schmidt & Buckhout, 2011). Auch ist bekannt, dass der Zink Transporter MTAP2 über den Eisenstatus und nicht über die Zinkkonzentration reguliert wird (Yang et al. 2010). Von daher liegt die Vermutung nahe, dass auch die VTL Transporter neben Eisen andere zweiwertige Metallionen transportieren.

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit, kann eine Funktion der VTLs im Transport von Zink und Mangan nicht ausgeschlossen werden, jedoch scheint sie eher eine sekundäre Rolle zu spielen und der Transport von Eisen, zumindest für VTL1, 2 und 5, die Hauptaufgabe darzustellen. Zwar konnte für *VTL1*, 2 und 5 eine signifikante Abnahme der Expression unter Zinkmangel gezeigt werden (Abb. 14). Trotzdem ist keines der *VTL* Gene in der Lage, die $\Delta zrc1$ Hefemutante zu komplementieren (Abb. 16). Unter Manganmangel kommt es in Pflanzen zu einer signifikanten Erhöhung der Expression von *VTL1* (Abb. 14). Außerdem ist VTL1 in der Lage, den Mutanten-Phänotyp der $\Delta pmr1$ und $\Delta smf1$ Hefemutanten schwach zu komplementieren (Abb. 17). SMF1p ist ein an der Plasmamembran lokalisierter Transporter, der essentiell ist für Manganaufnahme in die Zellen (Supek et al. 1996). Die Aktivität von SMF1p wird stark von der externen Mangankonzentration reguliert (Liu & Culotta, 1999b; Liu & Culotta, 1999a; Supek et al. 1996; West et al. 1992). Wobei ein Überschuss an Mangan nach einer kurzen Toleranzphase in der die Expression von SMF1p verringert wird, zu einer Verschiebung der Lokalisation von der Plasmamembran zur Vakuole führt, wo SMF1p dann degradiert wird (Eguez et al. 2004; Liu & Culotta, 1999a). Der eigentliche Import von Mangan aus dem Zytosol in die Vakuole erfolgt durch CCC1p, der so gleichzeitig eine Speicherung und Entgiftung ermöglicht (Li et al. 2001; Lapinskas et al. 1996). Die $\Delta smf1$ Mutante ist nicht fähig auf Mangan-Mangelmedium (Zusatz von $> 0,5$ mM EGTA) zu wachsen. Pmr1p (auch als BSD1 bekannt) ist eine am Golgi Apparat lokalisierte P-Typ ATPase die Ca^{2+} und Mn^{2+} Ionen in den Golgi transportiert (Lapinskas et al. 1995; Antebi & Fink, 1992; Rudolph et al. 1989). Die *knockout* Mutante $\Delta pmr1$ akkumuliert intrazelluläres Mangan und Kupfer und ist hypersensitiv gegenüber erhöhten Mangankonzentrationen ($> 0,7$ mM) (Lapinskas et al. 1995).

Obwohl die Hintergründe der einzelnen Komplementation in dieser Arbeit nicht aufgeklärt wurden, lassen die Ergebnisse vermuten, dass VTL1, ebenso wie VIT1 (Kim et al. 2006 b), Mangan transportieren kann.

4.6 Regulation der VTL Transporter

4.6.1 Transkriptionelle Regulation der Expression der *VTL* Gene

Im Gegensatz zu *VIT1* dessen Expression nicht vom Eisenstatus beeinflusst wird, wird die Expression der *VTL* Gene, wie gezeigt, u.a. von der Eisenkonzentration reguliert, wobei ein erhöhter Eisengehalt eine verstärkte Expression hervorruft (Abb. 8). Im Unterschied zu anderen bekannten Eisentransportern, werden die *VTLs* nicht von dem Transkriptionsfaktor FIT reguliert. Stattdessen konnte eine Regulation für *VTL1*, 2 und 5 durch ILR3 gezeigt

werden (Colangelo & Guerinot, 2004; Rampey et al. 2006). ILR3 ist ein *basic*-Helix-Loop-Helix Leucin Zipper Protein (bHLH105), welches in allen Geweben und Entwicklungsstadien exprimiert wird (Rampey et al. 2006). Noch ist unklar, in welcher Weise ILR3 die Expression der *VTLs* beeinflusst. Es wurde jedoch gezeigt, dass ILR3, ebenso wie die Transkriptionsfaktoren bHLH104 und bHLH115, mit einem weiteren Transkriptionsfaktor POPEYE (bHLH047, PYE) und einem multifunktionellen Protein BRUTUS (BTS) wechselwirkt und dass die Expression aller fünf Gene unter Eisenmangel induziert ist. PYE induziert direkt Eisenmangelantwort Gene wie *NAS4*, *ZIF1* und *FRO3*, wobei die Aktivität durch Heterodimerbildung mit ILR3 oder bHLH115 hervorgerufen wird. Zusammenfassend werden ILR3, bHLH115 und bHLH104 als Pye-likes (PYEL) bezeichnet (Selote et al. 2015; Long et al. 2010). BTS enthält mehrere verschiedene konservierte Domänen: eine putative E3 Ligase Domäne (Ring Domäne), drei Hämerythrin Kationen Binde Motive und CHY-, und CTCHY-Zink-Finger. Über die Hämerythrin Domänen kann BTS direkt Eisen und Zink binden (Kobayashi et al. 2013), was die Stabilität des BTS Proteins herabsetzt. Über die Ring Domäne interagiert BTS ebenfalls mit den PYEL, aber nicht mit PYE und vermittelt deren Abbau durch 26S Proteasom Degradation (Selote et al. 2015; Rampey et al. 2006). Für BTS wurde auch gezeigt, dass es die Expression typischer Eisenmangelantwort Gene negativ reguliert, wodurch ein zellulärer Eisenüberschuss vermieden wird (Kobayashi & Nishizawa, 2014). Kürzlich wurde von Selote et al. folgendes zusammenfassendes Modell vorgeschlagen: Unter Eisenmangel akkumulieren BTS, PYE und PYEL in der Zelle. Durch Heterodimerbildung von PYE und PYEL wird die Expression typischer Eisenmangelantwort Gene erhöht, gleichzeitig sorgt BTS für einen 26S Proteasom vermittelten Abbau von PYEL und gewährleistet so eine hinreichende aber nicht überschüssige Eisenaufnahme, indem es die Expression der Eisenmangelantwort Gene hemmt. Unter ausreichender Eisenversorgung ist das Expressionslevel von BTS, PYE und PYEL sehr gering, zusätzlich kommt es durch Bindung von Eisen an die Hämerythryndomänen zur Proteolyse von BTS (Selote et al. 2015). Bezogen auf die *VTL* Gene konnte gezeigt werden, dass der *knockout* von PYE (*pye-1*) zum einen zur Erhöhung der Expression von *VTL1*, 2 und 5 und zum anderen zur Erhöhung der Eisenkonzentration in der Wurzel sowohl unter Eisen suffizienten, wie auch defizienten Bedingungen führt. Dies deutet zum einen darauf hin, dass PYE auch in den Erhalt der Eisenhomöostase unter Eisen suffizienten Bedingungen involviert ist, bzw. es auch unter Mangelbedingungen zum lokalen Überschuss durch verstärkten Transport kommen kann (Long et al. 2010). Zum anderen scheint PYE auch ein Faktor innerhalb der *VTL* Regulation zu sein. Weiterhin zeigte die *gain of function* ILR3 Mutante (*ilr3-1*) eine verminderte

Expression von *VTL1*, 2 und 5 und die ILR3 *knockout* Mutante (*ilr3-2*), zumindest für *VTL2* eine leichte Expressionserhöhung (Rampey et al. 2006). Dies lässt vermuten, dass die Wechselwirkung von ILR3 und PYE unter Eisenmangelbedingungen neben der Aktivierung der Eisenmangelantwort Gene u.a. auch die Expression der *VTL* Gene hemmt. Im Umkehrschluss ist dann unter Eisen suffizienten Bedingungen die Hemmung aufgehoben und es kommt zu einer Aktivierung der *VTL* Gene, die für den Transport des Eisens in die Vakuole und oder in ein anderes Kompartiment bzw. aus der Zelle heraus sorgen.

4.6.2 Regulation der VTL Transporter untereinander- *vtl* Mutanten

Insgesamt zeigen viele Studien, dass die Regulation der Eisenhomöostase und die Sensorik des aktuellen Eisenstatus innerhalb der Pflanze sehr komplex sind und dass nur das Zusammenwirken von vielen Faktoren die nötige Feinabstimmung ermöglicht, so dass das aufgeführte Modell der PYE-ILR3-BTS Regulation ein weiterer Baustein im Gesamtgefüge sein könnte. Nicht zuletzt besteht die Möglichkeit der Wechselwirkung der VTL Transporter untereinander, wodurch eine weitere Regulationsebene vorliegen kann. Einen Hinweis darauf geben die Expressionsdaten der *vtl3* und *vtl5 knockout* Mutante. Insgesamt war die eisenabhängige Expression der *VTL* Gene nach 10 Tagen verschiedener Eisenfütterung in der *vtl3* Mutante schwach ausgeprägt. Auch die deutliche Abnahme bei 0 μM Eisen von *VTL1* und 2 konnte verglichen mit dem Wildtyp in der *vtl5* Mutante nicht detektiert werden (Abb. 32). Letzteres lässt vermuten, dass *VTL5* unter langfristigem Eisenmangel die Expression von *VTL1* und 2 in einer bisher unbekannten Weise beeinflusst. Die Ergebnisse der Kurzzeitantwort zeigten, dass *VTL3* in der *vtl5* Mutante stärker exprimiert war, bzw. *VTL5* in der *vtl3* Mutante schwächer exprimiert war als im Wildtyp (Abb. 33). Daraus leitet sich eine verstärkende und kompensierende Funktion von *VTL5* durch *VTL3* in der schnellen Eisenantwort ab. Auch konnte eine Expressionszunahme von *VTL4* unter Eisenüberschuss (120 μM) in allen Pflanzen gezeigt werden (Abb. 33). Da diese Konzentration jedoch nicht den physiologischen Bedingungen entspricht, ist die Relevanz dieses Ergebnisses fraglich. Die Untersuchung der Keimlinge zeigte überraschenderweise eine konstitutive und starke Expression von *VTL5* im Wildtyp und der *vtl3* Mutante, jedoch keine Veränderung von *VTL3* in der *vtl5* Mutante gegenüber dem Wildtyp (Abb. 34). Übereinstimmend mit den vorhandenen Daten aus *Genevestigator*, deutet dies auf eine verstärkte Aktivität von *VTL5* in Keimlingen und jungen Pflanzen hin (Abb. 39). Durchgängig, wurde in allen Expressionsanalysen der *vtl3* Mutante eine verringerte Expression von *VTL2*, verglichen mit dem Wildtyp, detektiert (Abb. 32, 33 und 34). Dies ist der deutlichste Beweis dafür, dass eine Wechselwirkung der VTL Proteine untereinander vorliegt.

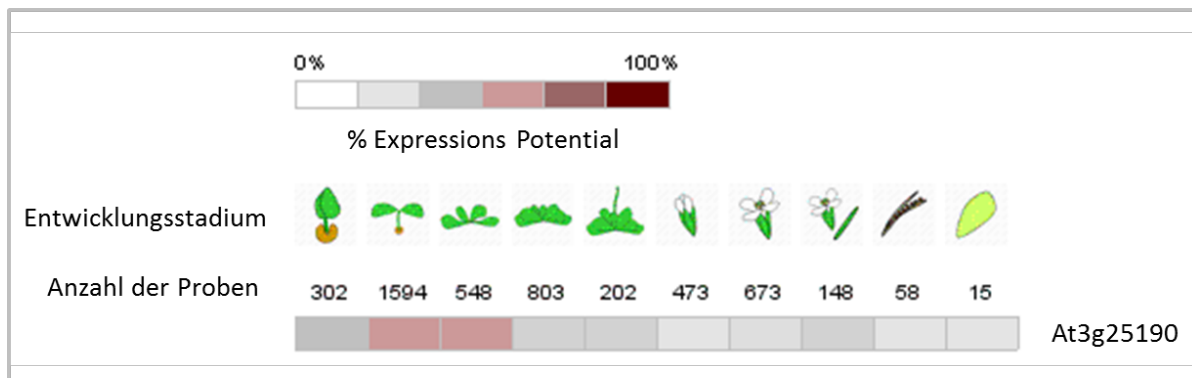


Abbildung 39: Entwicklungsstadium abhängige Expression von *VTL5*. *VTL5* wird bevorzugt in den Keimlingen und jungen Pflanzen exprimiert. Daten erhalten von Genevestigator (www.Genevestigator.com).

4.6.3 „*VTL1 knockout* Mutante“

Für weiterführende Analysen wäre auch die Charakterisierung einer *VTL1* T-DNA *knockout* Mutante von Relevanz. Diese ist allerdings nicht verfügbar und konnte im Rahmen dieser Arbeit, trotz verschiedener Bemühungen, nicht hergestellt werden. Allerdings deuten Zwischenergebnisse daraufhin, dass ein *knockout* von *VTL1* embryoletal wirkt (Abb. 36), was das Nicht-Vorhandensein dieser Mutante erklären würde. Dass in den Genevestigator Daten für *VTL1* eine bevorzugte Expression im Embryo gezeigt wird, unterstützt diese Vermutung. Die genaue Wirkung von *VTL1* im Embryo ist nicht bekannt. Bedenkt man jedoch, dass auch *VIT1* vorwiegend im Embryo exprimiert wird und die *vit1-1* Mutante unter Eisenmangelbedingungen ein stark gemindertes Wachstum der Keimlinge zeigt (Kim et al. 2006 b), scheinen beide Transporter nicht redundante, sehr spezielle Funktionen zu erfüllen, die entscheidend sind für die Samenbildung und Embryoentwicklung.

4.7 Modell

Zusammenfassend kann man anhand der Ergebnisse dieser Arbeit folgendes Modell aufstellen: Bei der kleinen Familie der *VTL* Gene aus *Arabidopsis thaliana* handelt es sich vermutlich um Metalltransporter, vorzugsweise Eisentransporter. Für *VTL1*, 2 und 5 wird eine Lokalisation an der Vakuolenmembran und der damit verbundene Transport von Eisen aus dem Zytosol in die Vakuole vorgeschlagen. Für *VTL3* und *VTL4* wird eine Lokalisation an der Plasmamembran und ein damit verbundener Transport von Eisen aus der Zelle vermutet (Abb. 40 a). Dabei kann der Transport von anderen zweiwertigen Metallionen wie z.B. Zink und Mangan nicht ausgeschlossen werden. Dass es neben *VIT1* und *FPN2* noch weitere vakuoläre Eisentransporter gibt, ist sehr wahrscheinlich, da Ähnliches auch für andere Metall Transporter bekannt ist. So gibt es in *Arabidopsis* alleine vier vakuoläre Zink Transporter (Schmidt & Buckhout, 2011; Kobae, 2004). Auch für Mangan konnte gezeigt

werden, dass es über mehrere Transporter (z.B. VIT1, YSL4 und 6) sequestriert wird (Conte et al. 2013; Kim et al. 2006 b). Für den Eisentransport aus der Vakuole sind zwei Transporter (Nramp3 und Nramp4) bekannt. Da für VIT1 und FPN2 eine stark gewebespezifisch gebundene Expression gezeigt wurde (Schaaf et al. 2006; Kim et al. 2006 b), ist es gut möglich, dass die VTL Transporter die gleiche Funktion in anderen Geweben übernehmen. Basierend auf den Genevestigator Daten (Abb. 38) und den Ergebnissen aus den Promotor-GUS Experimenten (Abb. 10) wird für *VTL1* eine bevorzugte Expression in den leitenden Geweben mit einer Präferenz zum Xylem vorgeschlagen, wobei eindeutige Signale in der Wurzel detektiert werden konnten. Außerdem scheint *VTL1*, wie VIT1, stark im Samen exprimiert zu werden. *VTL5* wird, wie *FPN2*, stark in der Wurzel exprimiert, jedoch nicht in den Epidermiszellen, sondern im vaskulären System. Für VTL2, 3 und 4 können nur die Genevestigator Daten herangezogen werden. Anhand derer wird für VTL2 und VTL3 eine Lokalisation im Spross vorgeschlagen (Abb. 40 b). Für VTL4 konnten innerhalb dieser Arbeit, bezüglich der organspezifischen Lokalisation keine Daten gewonnen werden. Insgesamt konnte aber für alle VTLs eine eindeutige Eisentransportfähigkeit durch die Komplementation der $\Delta ccc1$, *vit1-1* und *nramp3/4* Mutante und den veränderten Eisengehalt in heterolog *VTL* exprimierenden $\Delta ccc1$ Zellen/ Vakuolen, gezeigt werden.

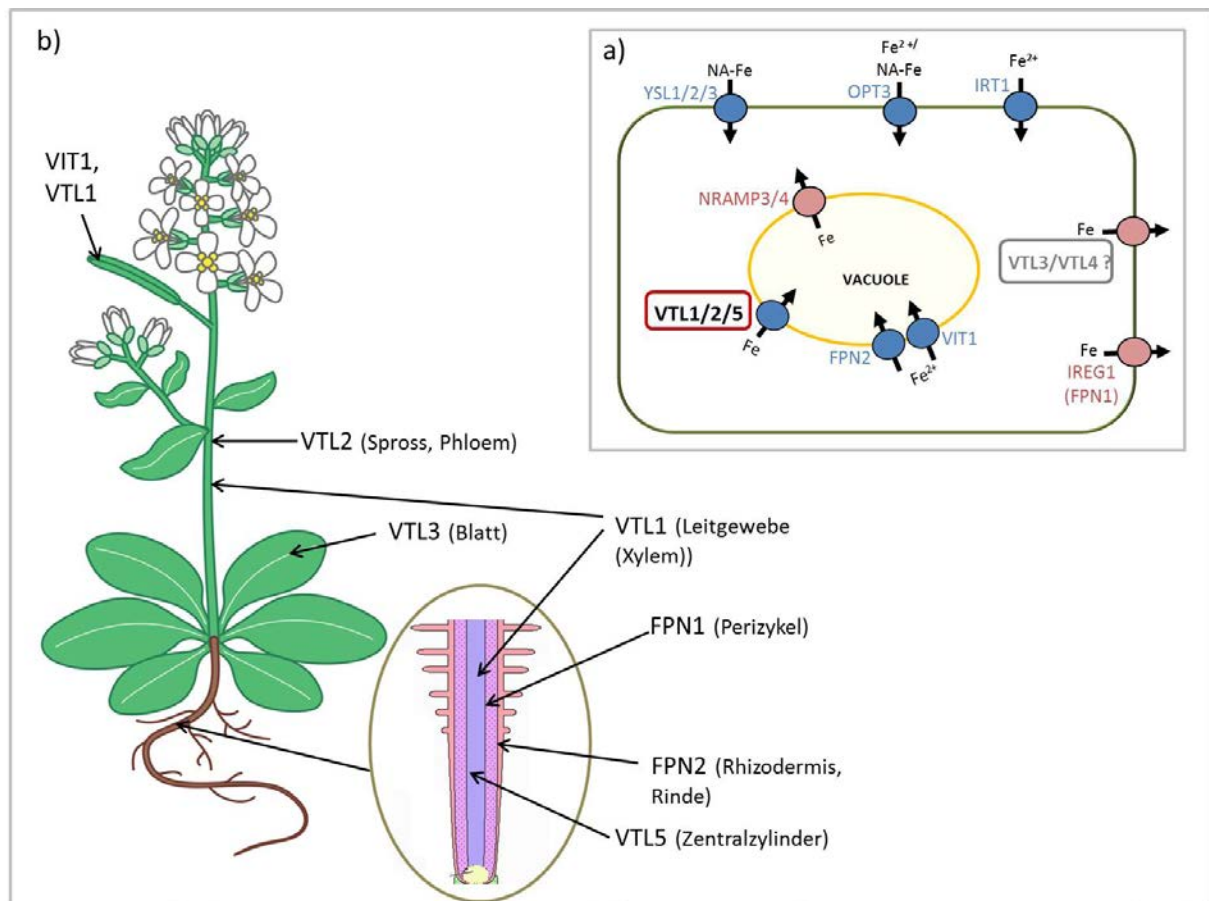


Abbildung 40: Modell über die Wirkungsweise der VTL Transporter. a) Zelluläre Lokalisation: bekannte Eisenimporter (blau), bekannte Eisenexporter (rot), VTL1, 2 und 5 sind vakuoläre Eisenimporter (schwarz), VTL3 und 4 unbewiesene Lokalisation an der Plasmamembran (grau). b) Organspezifische Expression der *VTL* Gene (ohne *VTL4*), der vakuolären Eisentransporter *VIT1* und *FPN2* und dem Plasmamembran lokalisierten Eisenexporter *FPN1*.

4.8 Ausblick

4.8.1 Relevanz der identifizierten Genfamilie

Schon viele vorherige Ergebnisse haben gezeigt, wie komplex die Regulation der Eisenhomöostase ist. Um das Gleichgewicht zwischen Bedarf und Toxizität durch Überschuss zu halten, bedarf es der genauen Abstimmung zwischen Aufnahme, inter- und intrazellulärem Transport und Speicherung. Dabei konnte für verschiedene Faktoren (z.B. PYE) gezeigt werden, dass sie sowohl unter Eisen suffizienten wie auch Eisenmangelbedingungen aktiv sind und entsprechend agieren, was ansatzweise die Komplexität des Eisenhaushaltes innerhalb der Pflanze verdeutlicht. Die *VTL* Gene stellen einen weiteren Baustein innerhalb des Eisenhaushaltes dar. Sie kodieren alle für putative Eisentransporter, von denen für VTL1 und VTL2 eine Lokalisation an der Vakuolenmembran nachgewiesen werden konnte. Die Tatsache, dass die Überexpression von *VTL1*, 2 und 5 in der *nramp3/nramp4* Doppelmutante eine Erhöhung der Eisenkonzentration im Samen hervorruft, könnte agrarökologische und wirtschaftliche Relevanz besitzen. Wenn das Eisen in einer nutzbaren Form vorliegt, führt

dies zur Ertragssteigerung der Pflanzen, außerdem könnte dadurch zum einen besseres Saatgut für die kommenden Generationen erzeugt werden und zum anderen, bei entsprechender Züchtung von Kulturpflanzen, ein beträchtlicher Gewinn in der Eisenversorgung der Sekundärkonsumenten errungen werden.

4.8.2 Fortführende Untersuchungen

Um die Funktionen und Lokalisation der *VTL* Gene vollständig aufzuklären, müssen noch zahlreiche Experimente erfolgen. In einem ersten Schritt würde die Untersuchung der Expression *in vivo* mittels GFP oder mCherry markierter *VTL* Gene die Aufklärung der zellspezifischen Lokalisation ermöglichen. Weiterhin bietet die Vermutung, dass ein *knockout* von *VTL1* embryonal zu wirken scheint, einen interessanten Ausgangspunkt. Hier wäre das Erzeugen von induzierbaren RNAi Konstrukten erstrebenswert. Eine potentielle Wechselwirkung der VTLs untereinander könnte mittels Hefe-zwei-Hybrid System oder *pulldown-assays* untersucht werden. Die Untersuchung der Expressionsmuster der *VTLs* im *vit1-1* Hintergrund könnte ebenfalls einen Hinweis auf eine mögliche Wechselwirkung geben. Nicht zuletzt muss die Erhöhung der Eisenkonzentration in Samen durch Überexpression der *VTL* Gene, auf eine verlässliche Reproduzierbarkeit und Übertragbarkeit in Kulturpflanzen hin untersucht bzw. die daraus erhoffte, entstehende Nutzbarkeit überprüft werden.

Summa summarum bietet das Feld der *VTL* Gene noch einige Möglichkeiten für zukünftige Arbeiten, denen diese Arbeit mit der Einordnung der *VTL* Gene in den Eisentransport als Grundlage dient.

5. Verzeichnisse

5.1.Literaturverzeichnis

- Abboud, S., and D. J. Haile. 2000. "A Novel Mammalian Iron-Regulated Protein Involved in Intracellular Iron Metabolism." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (26): 19906–12. doi:10.1074/jbc.M000713200.
- Adkins, S., and M. Burmeister. 1996. "Visualization of DNA in Agarose Gels as Migrating Colored Bands: Applications for Preparative Gels and Educational Demonstrations." *Analytical Biochemistry* 240 (1): 17–23. doi:10.1006/abio.1996.0325.
- Allen, Michael D., José A. del Campo, Janette Kropat, and Sabeeha S. Merchant. 2007. "FEA1, FEA2, and FRE1, Encoding Two Homologous Secreted Proteins and a Candidate Ferriredutase, Are Expressed Coordinately with FOX1 and FTR1 in Iron-Deficient *Chlamydomonas Reinhardtii*." *Eukaryotic Cell* 6 (10): 1841–52. doi:10.1128/EC.00205-07.
- Antebi, A., and G. R. Fink. 1992. "The Yeast Ca(2+)-ATPase Homologue, PMR1, Is Required for Normal Golgi Function and Localizes in a Novel Golgi-like Distribution." *Molecular Biology of the Cell* 3 (6): 633–54.
- Askwith, C, D Eide, A Van Ho, P S Bernard, L Li, S Davis-Kaplan, D M Sipe, and J Kaplan. 1994. "The FET3 Gene of *S. Cerevisiae* Encodes a Multicopper Oxidase Required for Ferrous Iron Uptake." *Cell* 76 (2): 403–10.
- Babcock, M, D de Silva, R Oaks, S Davis-Kaplan, S Jiralerspong, L Montermini, M Pandolfo, and J Kaplan. 1997. "Regulation of Mitochondrial Iron Accumulation by Yfh1p, a Putative Homolog of Frataxin." *Science (New York, N.Y.)* 276 (5319): 1709–12.
- Bacaicoa, Eva, Verónica Mora, Angel María Zamarreño, Marta Fuentes, Esther Casanova, and José María García-Mina. 2011. "Auxin: A Major Player in the Shoot-to-Root Regulation of Root Fe-Stress Physiological Responses to Fe Deficiency in Cucumber Plants." *Plant Physiology and Biochemistry: PPB / Société Française de Physiologie Végétale* 49 (5): 545–56. doi:10.1016/j.plaphy.2011.02.018.
- Bang, Woo Young, In Sil Jeong, Dae Won Kim, Chak Han Im, Chen Ji, Sung Min Hwang, Se Won Kim, et al. 2008. "Role of Arabidopsis CHL27 Protein for Photosynthesis, Chloroplast Development and Gene Expression Profiling." *Plant & Cell Physiology* 49 (9): 1350–63. doi:10.1093/pcp/pcn111.
- Barberon, Marie, Enric Zelazny, Stéphanie Robert, Geneviève Conéjéro, Cathy Curie, Jiri Friml, and Grégory Vert. 2011. "Monoubiquitin-Dependent Endocytosis of the Iron-Regulated Transporter 1 (IRT1) Transporter Controls Iron Uptake in Plants." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (32): E450–58. doi:10.1073/pnas.1100659108.
- Becker, D., E. Kemper, J. Schell, and R. Masterson. 1992. "New Plant Binary Vectors with Selectable Markers Located Proximal to the Left T-DNA Border." *Plant Molecular Biology* 20 (6): 1195–97.
- Bewley, J. D. 1997. "Seed Germination and Dormancy." *The Plant Cell* 9 (7): 1055–66. doi:10.1105/tpc.9.7.1055.
- Bienfait, H F. 1985. "Regulated Redox Processes at the Plasmalemma of Plant Root Cells and Their Function in Iron Uptake." *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 17 (2): 73–83.
- Bienfait, H F, W van den Briel, and N T Mesland-Mul. 1985. "Free Space Iron Pools in Roots: Generation and Mobilization." *Plant Physiology* 78 (3): 596–600.

- Birnboim, H C, and J Doly. 1979. "A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA." *Nucleic Acids Research* 7 (6): 1513–23.
- Blaiseau, P. L., E. Lesuisse, and J. M. Camadro. 2001. "Aft2p, a Novel Iron-Regulated Transcription Activator That Modulates, with Aft1p, Intracellular Iron Use and Resistance to Oxidative Stress in Yeast." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (36): 34221–26. doi:10.1074/jbc.M104987200.
- Bode, H P, M Dumschat, S Garotti, and G F Fuhrmann. 1995. "Iron Sequestration by the Yeast Vacuole. A Study with Vacuolar Mutants of *Saccharomyces Cerevisiae*." *European Journal of Biochemistry / FEBS* 228 (2): 337–42.
- Bradford, M. M. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Analytical Biochemistry* 72 (May): 248–54.
- Briat, Jean-François, Catherine Curie, and Frédéric Gaymard. 2007. "Iron Utilization and Metabolism in Plants." *Current Opinion in Plant Biology* 10 (3): 276–82. doi:10.1016/j.pbi.2007.04.003.
- Briat, J F. 1999. "Plant Ferritin and Human Iron Deficiency." *Nature Biotechnology* 17 (7): 621. doi:10.1038/10797.
- Briat, JF, I Fobis-Loisy, N Grignon, S Lobréaux, N Pascal, G Savino, S Thoiron, N Wirèn, and O Van Wuytswinkel. 1995. "Cellular and Molecular Aspects of Iron Metabolism in Plants.," no. 84: 69–81.
- Buckhout, Thomas J, Thomas J W Yang, and Wolfgang Schmidt. 2009. "Early Iron-Deficiency-Induced Transcriptional Changes in Arabidopsis Roots as Revealed by Microarray Analyses." *BMC Genomics* 10: 147. doi:10.1186/1471-2164-10-147.
- Bughio, Naimatullah, Hirotaka Yamaguchi, Naoko K Nishizawa, Hiromi Nakanishi, and Satoshi Mori. 2002. "Cloning an Iron-Regulated Metal Transporter from Rice." *Journal of Experimental Botany* 53 (374): 1677–82.
- Bulteau, Anne-Laure, Heather A O'Neill, Mary Claire Kennedy, Masao Ikeda-Saito, Grazia Isaya, and Luke I Szweda. 2004. "Frataxin Acts as an Iron Chaperone Protein to Modulate Mitochondrial Aconitase Activity." *Science (New York, N.Y.)* 305 (5681): 242–45. doi:10.1126/science.1098991.
- Busch, Andreas, Blandine Rimbauld, Bianca Naumann, Stefan Rensch, and Michael Hippler. 2008. "Ferritin Is Required for Rapid Remodeling of the Photosynthetic Apparatus and Minimizes Photo-Oxidative Stress in Response to Iron Availability in *Chlamydomonas Reinhardtii*." *The Plant Journal* 55 (2): 201–11. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03490.x.
- Busi, Maria V, María V Maliandi, Hugo Valdez, Marina Clemente, Eduardo J Zabaleta, Alejandro Araya, and Diego F Gomez-Casati. 2006. "Deficiency of Arabidopsis Thaliana Frataxin Alters Activity of Mitochondrial Fe-S Proteins and Induces Oxidative Stress." *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 48 (6): 873–82. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02923.x.
- Busi, Maria V, Eduardo J Zabaleta, Alejandro Araya, and Diego F Gomez-Casati. 2004. "Functional and Molecular Characterization of the Frataxin Homolog from Arabidopsis Thaliana." *FEBS Letters* 576 (1-2): 141–44. doi:10.1016/j.febslet.2004.09.003.
- Campbell, Neil A, Anselm Kratochwil, Thomas Lazar, and Jane B Reece. 2009. *Biologie*. München [u.a.]: Pearson Studium.
- Chang S., Kim B., Kang B., Kim D., and Nam H. 1994. "Stable Genetic Transformation of Arabidopsis Thaliana by Agrobacterium Inoculation in Planta," 5(4), , 551–58.
- Chao, Q., M. Rothenberg, R. Solano, G. Roman, W. Terzaghi, and J. R. Ecker. 1997. "Activation of the Ethylene Gas Response Pathway in Arabidopsis by the Nuclear Protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and Related Proteins." *Cell* 89 (7): 1133–44.

- Chen, D. C., B. C. Yang, and T. T. Kuo. 1992. "One-Step Transformation of Yeast in Stationary Phase." *Current Genetics* 21 (1): 83–84.
- Chen, Sixue, Rocío Sánchez-Fernández, Elise R Lyver, Andrew Dancis, and Philip A Rea. 2007. "Functional Characterization of AtATM1, AtATM2, and AtATM3, a Subfamily of Arabidopsis Half-Molecule ATP-Binding Cassette Transporters Implicated in Iron Homeostasis." *The Journal of Biological Chemistry* 282 (29): 21561–71. doi:10.1074/jbc.M702383200.
- Chen, Wei Wei, Jian Li Yang, Cheng Qin, Chong Wei Jin, Ji Hao Mo, Ting Ye, and Shao Jian Zheng. 2010. "Nitric Oxide Acts Downstream of Auxin to Trigger Root Ferric-Chelate Reductase Activity in Response to Iron Deficiency in Arabidopsis." *Plant Physiology* 154 (2): 810–19. doi:10.1104/pp.110.161109.
- Chen, X Z, J B Peng, A Cohen, H Nelson, N Nelson, and M A Hediger. 1999. "Yeast SMF1 Mediates H(+)-Coupled Iron Uptake with Concomitant Uncoupled Cation Currents." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (49): 35089–94.
- Chu, Heng-Hsuan, Jeff Chiecko, Tracy Punshon, Antonio Lanzirrotti, Brett Lahner, David E Salt, and Elsbeth L Walker. 2010. "Successful Reproduction Requires the Function of Arabidopsis Yellow Stripe-Like1 and Yellow Stripe-Like3 Metal-Nicotianamine Transporters in Both Vegetative and Reproductive Structures." *Plant Physiology* 154 (1): 197–210. doi:10.1104/pp.110.159103.
- Cohen, null, null Fox, null Garvin, and null Kochian. 1998. "The Role of Iron-Deficiency Stress Responses in Stimulating Heavy-Metal Transport in Plants." *Plant Physiology* 116 (3): 1063–72.
- Colangelo, Elizabeth P., and Mary Lou Guerinot. 2004. "The Essential Basic Helix-Loop-Helix Protein FIT1 Is Required for the Iron Deficiency Response." *The Plant Cell* 16 (12): 3400–3412. doi:10.1105/tpc.104.024315.
- Conklin, D. S., M. R. Culbertson, and C. Kung. 1994. "Interactions between Gene Products Involved in Divalent Cation Transport in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Molecular & General Genetics: MGG* 244 (3): 303–11.
- Conklin, D. S., J. A. McMaster, M. R. Culbertson, and C. Kung. 1992. "COT1, a Gene Involved in Cobalt Accumulation in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Molecular and Cellular Biology* 12 (9): 3678–88.
- Connolly, Erin L., Nathan H. Campbell, Natasha Grotz, Charis L. Prichard, and Mary Lou Guerinot. 2003. "Overexpression of the FRO2 Ferric Chelate Reductase Confers Tolerance to Growth on Low Iron and Uncovers Posttranscriptional Control." *Plant Physiology* 133 (3): 1102–10. doi:10.1104/pp.103.025122.
- Connolly, Erin L, Janette P Fett, and Mary Lou Guerinot. 2002. "Expression of the IRT1 Metal Transporter Is Controlled by Metals at the Levels of Transcript and Protein Accumulation." *The Plant Cell* 14 (6): 1347–57.
- Conte, S. S., H. H. Chu, D. C. Rodriguez, T. Punshon, K. A. Vasques, D. E. Salt, and E. L. Walker. 2013. "Arabidopsis Thaliana Yellow Stripe1-Like4 and Yellow Stripe1-Like6 Localize to Internal Cellular Membranes and Are Involved in Metal Ion Homeostasis." *Frontiers in Plant Science* 4. doi:10.3389/fpls.2013.00283.
- Courel, Maïté, Sylvie Lallet, Jean-Michel Camadro, and Pierre-Louis Blaiseau. 2005. "Direct Activation of Genes Involved in Intracellular Iron Use by the Yeast Iron-Responsive Transcription Factor Aft2 without Its Paralog Aft1." *Molecular and Cellular Biology* 25 (15): 6760–71. doi:10.1128/MCB.25.15.6760-6771.2005.
- Curie, Catherine, Gaëlle Cassin, Daniel Couch, Fanchon Divol, Kyoko Higuchi, Marie Le Jean, Julie Misson, Adam Schikora, Pierre Czernic, and Stéphane Mari. 2009. "Metal Movement within the Plant: Contribution of Nicotianamine and Yellow Stripe 1-like Transporters." *Annals of Botany* 103 (1): 1–11. doi:10.1093/aob/mcn207.

- Curie, C, Z Panaviene, C Loulergue, S L Dellaporta, J F Briat, and E L Walker. 2001. "Maize Yellow stripe1 Encodes a Membrane Protein Directly Involved in Fe(III) Uptake." *Nature* 409 (6818): 346–49. doi:10.1038/35053080.
- Dancis, A, D Haile, D S Yuan, and R D Klausner. 1994. "The *Saccharomyces Cerevisiae* Copper Transport Protein (Ctr1p). Biochemical Characterization, Regulation by Copper, and Physiologic Role in Copper Uptake." *The Journal of Biological Chemistry* 269 (41): 25660–67.
- Dancis, A, R D Klausner, A G Hinnebusch, and J G Barriocanal. 1990. "Genetic Evidence That Ferric Reductase Is Required for Iron Uptake in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Molecular and Cellular Biology* 10 (5): 2294–2301.
- De Benoist, Bruno, World Health Organization, and Centers for Disease Control and Prevention (U.S.). 2008. *Worldwide Prevalence of Anaemia 1993-2005 of WHO Global Database of Anaemia*. Geneva: World Health Organization. http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241596657_eng.pdf.
- Dello Ioio, Raffaele, Francisco Scaglia Linhares, Emanuele Scacchi, Eva Casamitjana-Martinez, Renze Heidstra, Paolo Costantino, and Sabrina Sabatini. 2007. "Cytokinins Determine Arabidopsis Root-Meristem Size by Controlling Cell Differentiation." *Current Biology: CB* 17 (8): 678–82. doi:10.1016/j.cub.2007.02.047.
- DiDonato, Raymond J, Jr, Louis A Roberts, Tamara Sanderson, Robynn Bosler Easley, and Elsbeth L Walker. 2004. "Arabidopsis Yellow Stripe-Like2 (YSL2): A Metal-Regulated Gene Encoding a Plasma Membrane Transporter of Nicotianamine-Metal Complexes." *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 39 (3): 403–14. doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02128.x.
- Dinneny, José R, Terri A Long, Jean Y Wang, Jee W Jung, Daniel Mace, Solomon Pointer, Christa Barron, Siobhan M Brady, John Schiefelbein, and Philip N Benfey. 2008. "Cell Identity Mediates the Response of Arabidopsis Roots to Abiotic Stress." *Science (New York, N.Y.)* 320 (5878): 942–45. doi:10.1126/science.1153795.
- Dix, D, J Bridgham, M Broderius, and D Eide. 1997. "Characterization of the FET4 Protein of Yeast. Evidence for a Direct Role in the Transport of Iron." *The Journal of Biological Chemistry* 272 (18): 11770–77.
- Dix, D R, J T Bridgham, M A Broderius, C A Byersdorfer, and D J Eide. 1994. "The FET4 Gene Encodes the Low Affinity Fe(II) Transport Protein of *Saccharomyces Cerevisiae*." *The Journal of Biological Chemistry* 269 (42): 26092–99.
- Durrett, Timothy P, Walter Gassmann, and Elizabeth E Rogers. 2007. "The FRD3-Mediated Efflux of Citrate into the Root Vasculature Is Necessary for Efficient Iron Translocation." *Plant Physiology* 144 (1): 197–205. doi:10.1104/pp.107.097162.
- Duy, Daniela, Gerhard Wanner, Anderson R Meda, Nicolaus von Wirén, Jürgen Soll, and Katrin Philippar. 2007. "PIC1, an Ancient Permease in Arabidopsis Chloroplasts, Mediates Iron Transport." *The Plant Cell* 19 (3): 986–1006. doi:10.1105/tpc.106.047407.
- Eckhardt, U. 2000. "Untersuchungen Zur Eisenassimilation in Pflanzen." Berlin: Humboldt Universität zu Berlin.
- Eckhardt, U, and Thomas J Buckhout. 1998. "Iron Assimilation in *Chlamydomonas Reinhardtii* Involves Ferric Reduction and Is Similar to Strategy I Higher Plants," 49, , 1219–24.
- Eguez, Lorena, Young-Sook Chung, Ajay Kuchibhatla, Madan Paidhungat, and Stephen Garrett. 2004. "Yeast Mn²⁺ Transporter, Smf1p, Is Regulated by Ubiquitin-Dependent Vacuolar Protein Sorting." *Genetics* 167 (1): 107–17.
- Eide, D, M Broderius, J Fett, and M L Guerinot. 1996. "A Novel Iron-Regulated Metal Transporter from Plants Identified by Functional Expression in Yeast." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (11): 5624–28.

- Eide, D J. 1998. "The Molecular Biology of Metal Ion Transport in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Annual Review of Nutrition* 18: 441–69. doi:10.1146/annurev.nutr.18.1.441.
- Fischer, Hans, and Ferdinand Baláž. 1942. "Über Desvinyl-phylochlorin, seine Teilsynthese und die des 2-Desvinyl-2-acetyl-phylochlorins." *Justus Liebig's Annalen der Chemie* 553 (1): 166–86. doi:10.1002/jlac.19425530109.
- Fuglsang, Anja T., Yan Guo, Tracey A. Cuin, Quansheng Qiu, Chunpeng Song, Kim A. Kristiansen, Katrine Bych, et al. 2007. "Arabidopsis Protein Kinase PKS5 Inhibits the Plasma Membrane H⁺-ATPase by Preventing Interaction with 14-3-3 Protein." *The Plant Cell* 19 (5): 1617–34. doi:10.1105/tpc.105.035626.
- García, María J, Carlos Lucena, Francisco J Romera, Esteban Alcántara, and Rafael Pérez-Vicente. 2010. "Ethylene and Nitric Oxide Involvement in the up-Regulation of Key Genes Related to Iron Acquisition and Homeostasis in Arabidopsis." *Journal of Experimental Botany* 61 (14): 3885–99. doi:10.1093/jxb/erq203.
- García, María J., Francisco J. Romera, Minviluz G. Stacey, Gary Stacey, Eduardo Villar, Esteban Alcántara, and Rafael Pérez-Vicente. 2012. "Shoot to Root Communication Is Necessary to Control the Expression of Iron-Acquisition Genes in Strategy I Plants." *Planta* 237 (1): 65–75. doi:10.1007/s00425-012-1757-0.
- García, María J, Vicente Suárez, Francisco J Romera, Esteban Alcántara, and Rafael Pérez-Vicente. 2011. "A New Model Involving Ethylene, Nitric Oxide and Fe to Explain the Regulation of Fe-Acquisition Genes in Strategy I Plants." *Plant Physiology and Biochemistry: PPB / Société Française de Physiologie Végétale* 49 (5): 537–44. doi:10.1016/j.plaphy.2011.01.019.
- Georgatsou, E, and D Alexandraki. 1994. "Two Distinctly Regulated Genes Are Required for Ferric Reduction, the First Step of Iron Uptake in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Molecular and Cellular Biology* 14 (5): 3065–73.
- Georgatsou, E., L. A. Mavrogiannis, G. S. Fragiadakis, and D. Alexandraki. 1997. "The Yeast Fre1p/Fre2p Cupric Reductases Facilitate Copper Uptake and Are Regulated by the Copper-Modulated Mac1p Activator." *The Journal of Biological Chemistry* 272 (21): 13786–92.
- Glaesener, Anne G., Sabeeha S. Merchant, and Crysten E. Blaby-Haas. 2013. "Iron Economy in *Chlamydomonas Reinhardtii*." *Frontiers in Plant Science* 4: 337. doi:10.3389/fpls.2013.00337.
- Gollhofer, Julia, Christin Schläwicke, Nadine Jungnick, Wolfgang Schmidt, and Thomas J. Buckhout. 2011. "Members of a Small Family of Nodulin-like Genes Are Regulated under Iron Deficiency in Roots of Arabidopsis Thaliana." *Plant Physiology and Biochemistry* 49 (5): 557–64. doi:10.1016/j.plaphy.2011.02.011.
- Gollhofer, Julia, Roman Timofeev, Ping Lan, Wolfgang Schmidt, and Thomas J. Buckhout. 2014. "Vacuolar-Iron-transporter1-like Proteins Mediate Iron Homeostasis in Arabidopsis." *PloS One* 9 (10): e110468. doi:10.1371/journal.pone.0110468.
- Govers, F, T Gloudemans, M Moerman, A van Kammen, and T Bisseling. 1985. "Expression of Plant Genes during the Development of Pea Root Nodules." *The EMBO Journal* 4 (4): 861–67.
- Graziano, Magdalena, and Lorenzo Lamattina. 2007. "Nitric Oxide Accumulation Is Required for Molecular and Physiological Responses to Iron Deficiency in Tomato Roots." *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 52 (5): 949–60. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03283.x.
- Green, Laura S, and Elizabeth E Rogers. 2004. "FRD3 Controls Iron Localization in Arabidopsis." *Plant Physiology* 136 (1): 2523–31. doi:10.1104/pp.104.045633.
- Gris, E. 1844. "Nouvelles expériences sur l'action des composés ferrugineux solubles, et de la débilite Des Plantes.," no. 19: 1118–19.

- Grusak, M. A. 1994. "Iron Transport to Developing Ovules of *Pisum Sativum* (I. Seed Import Characteristics and Phloem Iron-Loading Capacity of Source Regions)." *Plant Physiology* 104 (2): 649–55.
- Guerinot, M. L., and Y. Yi. 1994. "Iron: Nutritious, Noxious, and Not Readily Available." *Plant Physiology* 104 (3): 815–20.
- Hakoyama, Tsuneo, Kaori Niimi, Takeshi Yamamoto, Sawa Isobe, Shusei Sato, Yasukazu Nakamura, Satoshi Tabata, et al. 2012. "The Integral Membrane Protein SEN1 Is Required for Symbiotic Nitrogen Fixation in *Lotus Japonicus* Nodules." *Plant & Cell Physiology* 53 (1): 225–36. doi:10.1093/pcp/pcr167.
- Halliwell, B, and J M Gutteridge. 1990. "Role of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Disease: An Overview." *Methods in Enzymology* 186: 1–85.
- Hamada, Yasuhiro, Tomoko-Nii Kono, Yoshiyuki Moriguchi, Masato Higuchi, and Masafumi Fukagawa. 2008. "Alteration of mRNA Expression of Molecules Related to Iron Metabolism in Adenine-Induced Renal Failure Rats: A Possible Mechanism of Iron Deficiency in Chronic Kidney Disease Patients on Treatment." *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 23 (6): 1886–91. doi:10.1093/ndt/gfm900.
- Hanahan, D. 1983. "Studies on Transformation of *Escherichia Coli* with Plasmids." *Journal of Molecular Biology* 166 (4): 557–80.
- Haruta, Miyoshi, Heather L Burch, Rachel B Nelson, Greg Barrett-Wilt, Kelli G Kline, Sheher B Mohsin, Jeffery C Young, Marisa S Otegui, and Michael R Sussman. 2010. "Molecular Characterization of Mutant *Arabidopsis* Plants with Reduced Plasma Membrane Proton Pump Activity." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (23): 17918–29. doi:10.1074/jbc.M110.101733.
- Hassett, R F, D S Yuan, and D J Kosman. 1998. "Spectral and Kinetic Properties of the Fet3 Protein from *Saccharomyces Cerevisiae*, a Multinuclear Copper Ferroxidase Enzyme." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (36): 23274–82.
- Haydon, Michael J, and Christopher S Cobbett. 2007. "Transporters of Ligands for Essential Metal Ions in Plants." *The New Phytologist* 174 (3): 499–506. doi:10.1111/j.1469-8137.2007.02051.x.
- Heazlewood, J. L. 2004. "Experimental Analysis of the *Arabidopsis* Mitochondrial Proteome Highlights Signaling and Regulatory Components, Provides Assessment of Targeting Prediction Programs, and Indicates Plant-Specific Mitochondrial Proteins." *THE PLANT CELL ONLINE* 16 (1): 241–56. doi:10.1105/tpc.016055.
- Hell, Rüdiger, and Udo W Stephan. 2003. "Iron Uptake, Trafficking and Homeostasis in Plants." *Planta* 216 (4): 541–51. doi:10.1007/s00425-002-0920-4.
- Herbik, A. 2002. "The Involvement of a Multicopper Oxidase in Iron Uptake by the Green Algae *Chlamydomonas Reinhardtii*." *PLANT PHYSIOLOGY* 130 (4): 2039–48. doi:10.1104/pp.013060.
- Heymann, P., J. F. Ernst, and G. Winkelmann. 1999. "Identification of a Fungal Triacetylfusarinine C Siderophore Transport Gene (TAF1) in *Saccharomyces Cerevisiae* as a Member of the Major Facilitator Superfamily." *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine* 12 (4): 301–6.
- Hindt, Maria N., and Mary Lou Guerinot. 2012. "Getting a Sense for Signals: Regulation of the Plant Iron Deficiency Response." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1823 (9): 1521–30. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.03.010.
- Hintze, K J, and E C Theil. 2006. "Cellular Regulation and Molecular Interactions of the Ferritins." *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 63 (5): 591–600. doi:10.1007/s00018-005-5285-y.

- Hippler, M, J Klein, A Fink, T Allinger, and P Hoerth. 2001. "Towards Functional Proteomics of Membrane Protein Complexes: Analysis of Thylakoid Membranes from *Chlamydomonas Reinhardtii*." *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 28 (5): 595–606.
- Inoue, Haruhiko, Takanori Kobayashi, Tomoko Nozoye, Michiko Takahashi, Yusuke Kakei, Kazumasa Suzuki, Mikio Nakazono, Hiromi Nakanishi, Satoshi Mori, and Naoko K Nishizawa. 2009. "Rice OsYSL15 Is an Iron-Regulated iron(III)-Deoxymugineic Acid Transporter Expressed in the Roots and Is Essential for Iron Uptake in Early Growth of the Seedlings." *The Journal of Biological Chemistry* 284 (6): 3470–79. doi:10.1074/jbc.M806042200.
- Ishimaru, Yasuhiro, Motofumi Suzuki, Takashi Tsukamoto, Kazumasa Suzuki, Mikio Nakazono, Takanori Kobayashi, Yasuaki Wada, et al. 2006. "Rice Plants Take up Iron as an Fe³⁺-Phytosiderophore and as Fe²⁺." *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 45 (3): 335–46. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02624.x.
- Jain, Anshika, Grandon T. Wilson, and Erin L. Connolly. 2014. "The Diverse Roles of FRO Family Metalloreductases in Iron and Copper Homeostasis." *Frontiers in Plant Science* 5: 100. doi:10.3389/fpls.2014.00100.
- Jakoby, Marc, Hong-Yu Wang, Wim Reidt, Bernd Weisshaar, and Petra Bauer. 2004. "FRU (BHLH029) Is Required for Induction of Iron Mobilization Genes in Arabidopsis Thaliana." *FEBS Letters* 577 (3): 528–34. doi:10.1016/j.febslet.2004.10.062.
- Jaquinod, Michel, Florent Villiers, Sylvie Kieffer-Jaquinod, Véronique Hugouvieux, Christophe Bruley, Jérôme Garin, and Jacques Bourguignon. 2007. "A Proteomics Dissection of Arabidopsis Thaliana Vacuoles Isolated from Cell Culture." *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 6 (3): 394–412. doi:10.1074/mcp.M600250-MCP200.
- Jeong, Jeeyon, Christopher Cohu, Loubna Kerkeb, Marinus Pilon, Erin L Connolly, and Mary Lou Guerinot. 2008. "Chloroplast Fe(III) Chelate Reductase Activity Is Essential for Seedling Viability under Iron Limiting Conditions." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (30): 10619–24. doi:10.1073/pnas.0708367105.
- Jeong, Jeeyon, and Mary Lou Guerinot. 2009. "Homing in on Iron Homeostasis in Plants." *Trends in Plant Science* 14 (5): 280–85. doi:10.1016/j.tplants.2009.02.006.
- Jiang, L, T E Phillips, C A Hamm, Y M Drozdowicz, P A Rea, M Maeshima, S W Rogers, and J C Rogers. 2001. "The Protein Storage Vacuole: A Unique Compound Organelle." *The Journal of Cell Biology* 155 (6): 991–1002. doi:10.1083/jcb.200107012.
- Jin, Chong Wei, Guang Yi You, Yun Feng He, Caixian Tang, Ping Wu, and Shao Jian Zheng. 2007. "Iron Deficiency-Induced Secretion of Phenolics Facilitates the Reutilization of Root Apoplastic Iron in Red Clover." *Plant Physiology* 144 (1): 278–85. doi:10.1104/pp.107.095794.
- Kamizono, A., M. Nishizawa, Y. Teranishi, K. Murata, and A. Kimura. 1989. "Identification of a Gene Conferring Resistance to Zinc and Cadmium Ions in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*." *Molecular & General Genetics: MGG* 219 (1-2): 161–67.
- Kehrer, J. P. 2000. "The Haber-Weiss Reaction and Mechanisms of Toxicity." *Toxicology* 149 (1): 43–50.
- Kim, D.-Y., L. Bovet, S. Kushnir, E. W. Noh, E. Martinoia, and Y. Lee. 2006 a. "AtATM3 Is Involved in Heavy Metal Resistance in Arabidopsis." *PLANT PHYSIOLOGY* 140 (3): 922–32. doi:10.1104/pp.105.074146.
- Kim, Sun A, Tracy Punshon, Antonio Lanzirrotti, Liangtao Li, José M Alonso, Joseph R Ecker, Jerry Kaplan, and Mary Lou Guerinot. 2006 b. "Localization of Iron in Arabidopsis Seed Requires the Vacuolar Membrane Transporter VIT1." *Science (New York, N.Y.)* 314 (5803): 1295–98. doi:10.1126/science.1132563.

- Kispal, G, P Csere, B Guiard, and R Lill. 1997. "The ABC Transporter Atm1p Is Required for Mitochondrial Iron Homeostasis." *FEBS Letters* 418 (3): 346–50.
- Kobae, Y. 2004. "Zinc Transporter of Arabidopsis Thaliana AtMTP1 Is Localized to Vacuolar Membranes and Implicated in Zinc Homeostasis." *Plant and Cell Physiology* 45 (12): 1749–58. doi:10.1093/pcp/pci015.
- Kobayashi, Takanori, Reiko Nakanishi Itai, May Sann Aung, Takeshi Senoura, Hiromi Nakanishi, and Naoko K. Nishizawa. 2012. "The Rice Transcription Factor IDEF1 Directly Binds to Iron and Other Divalent Metals for Sensing Cellular Iron Status." *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 69 (1): 81–91. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04772.x.
- Kobayashi, Takanori, Seiji Nagasaka, Takeshi Senoura, Reiko Nakanishi Itai, Hiromi Nakanishi, and Naoko K. Nishizawa. 2013. "Iron-Binding Haemerythrin RING Ubiquitin Ligases Regulate Plant Iron Responses and Accumulation." *Nature Communications* 4: 2792. doi:10.1038/ncomms3792.
- Kobayashi, Takanori, Yuko Nakayama, Reiko Nakanishi Itai, Hiromi Nakanishi, Toshihiro Yoshihara, Satoshi Mori, and Naoko K. Nishizawa. 2003. "Identification of Novel Cis-Acting Elements, IDE1 and IDE2, of the Barley IDS2 Gene Promoter Conferring Iron-Deficiency-Inducible, Root-Specific Expression in Heterogeneous Tobacco Plants." *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 36 (6): 780–93.
- Kobayashi, Takanori, and Naoko K. Nishizawa. 2014. "Iron Sensors and Signals in Response to Iron Deficiency." *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology* 224 (July): 36–43. doi:10.1016/j.plantsci.2014.04.002.
- Kobayashi, Takanori, Yuko Ogo, Reiko Nakanishi Itai, Hiromi Nakanishi, Michiko Takahashi, Satoshi Mori, and Naoko K. Nishizawa. 2007. "The Transcription Factor IDEF1 Regulates the Response to and Tolerance of Iron Deficiency in Plants." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (48): 19150–55. doi:10.1073/pnas.0707010104.
- Koike, Shintaro, Haruhiko Inoue, Daichi Mizuno, Michiko Takahashi, Hiromi Nakanishi, Satoshi Mori, and Naoko K. Nishizawa. 2004. "OsYSL2 Is a Rice Metal-Nicotianamine Transporter That Is Regulated by Iron and Expressed in the Phloem." *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 39 (3): 415–24. doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02146.x.
- Korshunova, Y O, D Eide, W G Clark, M L Gueriot, and H B Pakrasi. 1999. "The IRT1 Protein from Arabidopsis Thaliana Is a Metal Transporter with a Broad Substrate Range." *Plant Molecular Biology* 40 (1): 37–44.
- Kosman, Daniel J. 2003. "Molecular Mechanisms of Iron Uptake in Fungi." *Molecular Microbiology* 47 (5): 1185–97.
- Kosman, Daniel J. 2010. "Redox Cycling in Iron Uptake, Efflux, and Trafficking." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (35): 26729–35. doi:10.1074/jbc.R110.113217.
- Kumánovics, Attila, Opal S. Chen, Liangtao Li, Dustin Bagley, Erika M. Adkins, Huilan Lin, Nin N. Dingra, et al. 2008. "Identification of FRA1 and FRA2 as Genes Involved in Regulating the Yeast Iron Regulon in Response to Decreased Mitochondrial Iron-Sulfur Cluster Synthesis." *The Journal of Biological Chemistry* 283 (16): 10276–86. doi:10.1074/jbc.M801160200.
- Kushnir, S, E Babiychuk, S Storozhenko, M W Davey, J Papenbrock, R De Rycke, G Engler, et al. 2001. "A Mutation of the Mitochondrial ABC Transporter Stal Leads to Dwarfism and Chlorosis in the Arabidopsis Mutant Starik." *The Plant Cell* 13 (1): 89–100.
- Kwok, Ernest Y, Scott Severance, and Daniel J Kosman. 2006. "Evidence for Iron Channeling in the Fet3p-Ftr1p High-Affinity Iron Uptake Complex in the Yeast Plasma Membrane." *Biochemistry* 45 (20): 6317–27. doi:10.1021/bi052173c.

- Lanquar, Viviane, Françoise Lelièvre, Susanne Bolte, Cécile Hamès, Carine Alcon, Dieter Neumann, Gérard Vansuyt, et al. 2005. "Mobilization of Vacuolar Iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 Is Essential for Seed Germination on Low Iron." *The EMBO Journal* 24 (23): 4041–51. doi:10.1038/sj.emboj.7600864.
- Lanquar, Viviane, Magali Schnell Ramos, Françoise Lelièvre, Hélène Barbier-Brygoo, Anja Krieger-Liszkay, Ute Krämer, and Sébastien Thomine. 2010. "Export of Vacuolar Manganese by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 Is Required for Optimal Photosynthesis and Growth under Manganese Deficiency." *Plant Physiology* 152 (4): 1986–99. doi:10.1104/pp.109.150946.
- Lapinskas, P. J., K. W. Cunningham, X. F. Liu, G. R. Fink, and V. C. Culotta. 1995. "Mutations in PMR1 Suppress Oxidative Damage in Yeast Cells Lacking Superoxide Dismutase." *Molecular and Cellular Biology* 15 (3): 1382–88.
- Lapinskas, P. J., S. J. Lin, and V. C. Culotta. 1996. "The Role of the *Saccharomyces Cerevisiae* CCC1 Gene in the Homeostasis of Manganese Ions." *Molecular Microbiology* 21 (3): 519–28.
- Leighton, J., and G. Schatz. 1995. "An ABC Transporter in the Mitochondrial Inner Membrane Is Required for Normal Growth of Yeast." *The EMBO Journal* 14 (1): 188–95.
- Lei, Gui Jie, Xiao Fang Zhu, Zhi Wei Wang, Fang Dong, Ning Yu Dong, and Shao Jian Zheng. 2014. "Absciscic Acid Alleviates Iron Deficiency by Promoting Root Iron Reutilization and Transport from Root to Shoot in Arabidopsis." *Plant, Cell & Environment* 37 (4): 852–63. doi:10.1111/pce.12203.
- Lesuisse, E, F Raguzzi, and R R Crichton. 1987. "Iron Uptake by the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*: Involvement of a Reduction Step." *Journal of General Microbiology* 133 (11): 3229–36.
- Lesuisse, E, M Simon-Casteras, and P Labbe. 1998. "Siderophore-Mediated Iron Uptake in *Saccharomyces Cerevisiae*: The SIT1 Gene Encodes a Ferrioxamine B Permease That Belongs to the Major Facilitator Superfamily." *Microbiology (Reading, England)* 144 (Pt 12) (December): 3455–62.
- Levi, Sonia, and Paolo Arosio. 2004. "Mitochondrial Ferritin." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36 (10): 1887–89. doi:10.1016/j.biocel.2003.10.020.
- Lide, D. R. 2005. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. Boca Raton (Florida): CRC Press.
- Li, Haoran, Daphne T. Mapolelo, Nin N. Dingra, Sunil G. Naik, Nicholas S. Lees, Brian M. Hoffman, Pamela J. Riggs-Gelasco, Boi Hanh Huynh, Michael K. Johnson, and Caryn E. Outten. 2009. "The Yeast Iron Regulatory Proteins Grx3/4 and Fra2 Form Heterodimeric Complexes Containing a [2Fe-2S] Cluster with Cysteiny and Histidyl Ligation." *Biochemistry* 48 (40): 9569–81. doi:10.1021/bi901182w.
- Li, L, O S Chen, D McVey Ward, and J Kaplan. 2001. "CCC1 Is a Transporter That Mediates Vacuolar Iron Storage in Yeast." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (31): 29515–19. doi:10.1074/jbc.M103944200.
- Li, L, and J Kaplan. 1998. "Defects in the Yeast High Affinity Iron Transport System Result in Increased Metal Sensitivity because of the Increased Expression of Transporters with a Broad Transition Metal Specificity." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (35): 22181–87.
- Lingam, Sivasenkar, Julia Mohrbacher, Tzvetina Brumbarova, Thomas Potuschak, Claudia Fink-Straube, Eddy Blondet, Pascal Genschik, and Petra Bauer. 2011. "Interaction between the bHLH Transcription Factor FIT and ETHYLENE INSENSITIVE3/ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 Reveals Molecular Linkage between the Regulation of Iron Acquisition and Ethylene Signaling in Arabidopsis." *The Plant Cell* 23 (5): 1815–29. doi:10.1105/tpc.111.084715.

- Lin, Huilan, Attila Kumánovics, Jenifer M. Nelson, David E. Warner, Diane McVey Ward, and Jerry Kaplan. 2008. "A Single Amino Acid Change in the Yeast Vacuolar Metal Transporters ZRC1 and COT1 Alters Their Substrate Specificity." *The Journal of Biological Chemistry* 283 (49): 33865–73. doi:10.1074/jbc.M804377200.
- Liu, X. F., and V. C. Culotta. 1999a. "Post-Translation Control of Nramp Metal Transport in Yeast. Role of Metal Ions and the BSD2 Gene." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (8): 4863–68.
- Liu, X. F., and V. C. Culotta. 1999b. "Mutational Analysis of *Saccharomyces Cerevisiae* Smflp, a Member of the Nramp Family of Metal Transporters." *Journal of Molecular Biology* 289 (4): 885–91. doi:10.1006/jmbi.1999.2815.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods (San Diego, Calif.)* 25 (4): 402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262.
- Li, Weiqiong. 2014. "Untersuchung Der Lokalisation Und Funktion von Genen Der VTL-Familie Aus *A. Thaliana*.".
- Li, Xuexian, and Chunjian Li. 2004. "Is Ethylene Involved in Regulation of Root Ferric Reductase Activity of Dicotyledonous Species under Iron Deficiency?" *Plant and Soil* 261 (1/2): 147–53. doi:10.1023/B:PLSO.0000035536.79001.60.
- Long, J. C., F. Sommer, M. D. Allen, S.-F. Lu, and S. S. Merchant. 2008. "FER1 and FER2 Encoding Two Ferritin Complexes in *Chlamydomonas Reinhardtii* Chloroplasts Are Regulated by Iron." *Genetics* 179 (1): 137–47. doi:10.1534/genetics.107.083824.
- Long, T. A., H. Tsukagoshi, W. Busch, B. Lahner, D. E. Salt, and P. N. Benfey. 2010. "The bHLH Transcription Factor POPEYE Regulates Response to Iron Deficiency in Arabidopsis Roots." *THE PLANT CELL ONLINE* 22 (7): 2219–36. doi:10.1105/tpc.110.074096.
- Loukin, S., and C. Kung. 1995. "Manganese Effectively Supports Yeast Cell-Cycle Progression in Place of Calcium." *The Journal of Cell Biology* 131 (4): 1025–37.
- Lucena, Carlos, Brian M Waters, F Javier Romera, María José García, María Morales, Esteban Alcántara, and Rafael Pérez-Vicente. 2006. "Ethylene Could Influence Ferric Reductase, Iron Transporter, and H⁺-ATPase Gene Expression by Affecting FER (or FER-Like) Gene Activity." *Journal of Experimental Botany* 57 (15): 4145–54. doi:10.1093/jxb/erl189.
- Luster, D. G., and T. J. Buckhout. 1989. "Purification and Identification of a Plasma Membrane Associated Electron Transport Protein from Maize (*Zea Mays* L.) Roots." *Plant Physiology* 91 (3): 1014–19.
- Lynnes, J.A., T.L.M. Derzaph, and H.G. Weger. 1998. "Iron Limitation Results in Induction Ferricyanide Reductase and Ferric Chelate Reductase in *Chlamydomonas Reinhardtii*." 204, , 360–65.
- Mandel, M., and A. Higa. 1992. "Calcium-Dependent Bacteriophage DNA Infection. 1970." *Biotechnology (Reading, Mass.)* 24: 198–201.
- Margolis, Nathan. 2006. "Yeast Vacuole Isolation and Fusion Assay."
- Marschner, H. 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. 2nd edition. London: Academic Press.
- Marschner, H., and V. Römhild. 1994. "Strategies of Plants for Acquisition of Iron." *Plant and Soil* 165 (2): 261–74. doi:10.1007/BF00008069.
- Martins, L. J., L. T. Jensen, J. R. Simon, G. L. Keller, D. R. Winge, and J. R. Simons. 1998. "Metalloregulation of FRE1 and FRE2 Homologs in *Saccharomyces Cerevisiae*." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (37): 23716–21.
- Mäser, P, S Thomine, J I Schroeder, J M Ward, K Hirschi, H Sze, I N Talke, et al. 2001. "Phylogenetic Relationships within Cation Transporter Families of Arabidopsis." *Plant Physiology* 126 (4): 1646–67.

- McKie, A. T., P. Marciani, A. Rolfs, K. Brennan, K. Wehr, D. Barrow, S. Miret, et al. 2000. "A Novel Duodenal Iron-Regulated Transporter, IREG1, Implicated in the Basolateral Transfer of Iron to the Circulation." *Molecular Cell* 5 (2): 299–309.
- Meiser, Johannes, Sivasenkar Lingam, and Petra Bauer. 2011. "Posttranslational Regulation of the Iron Deficiency Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor FIT Is Affected by Iron and Nitric Oxide." *Plant Physiology* 157 (4): 2154–66. doi:10.1104/pp.111.183285.
- Momonoi, Kazumi, Kumi Yoshida, Shoji Mano, Hideyuki Takahashi, Chihiro Nakamori, Kazuaki Shoji, Akira Nitta, and Mikio Nishimura. 2009. "A Vacuolar Iron Transporter in Tulip, TgVit1, Is Responsible for Blue Coloration in Petal Cells through Iron Accumulation." *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 59 (3): 437–47. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03879.x.
- Moog, P R, T A van der Kooij, W Brüggemann, J W Schiefelbein, and P J Kuiper. 1995. "Responses to Iron Deficiency in Arabidopsis Thaliana: The Turbo Iron Reductase Does Not Depend on the Formation of Root Hairs and Transfer Cells." *Planta* 195 (4): 505–13.
- Mori, S, N Nishizawa, H Hayashi, E Chino, E Yoshimura, and J Ishihara. 1991. *Why Are Young Rice Plants Highly Susceptible to Iron Deficiency?*. Iron Nutrition and Interactions in Plants 130. Springer.
- Morrissey, Joe, Ivan R. Baxter, Joohyun Lee, Liangtao Li, Brett Lahner, Natasha Grotz, Jerry Kaplan, David E. Salt, and Mary Lou Guerinot. 2009. "The Ferroportin Metal Efflux Proteins Function in Iron and Cobalt Homeostasis in Arabidopsis." *The Plant Cell* 21 (10): 3326–38. doi:10.1105/tpc.109.069401.
- Morrissey, Joe, and Mary Lou Guerinot. 2009. "Iron Uptake and Transport in Plants: The Good, the Bad, and the Ionome." *Chemical Reviews* 109 (10): 4553–67. doi:10.1021/cr900112r.
- Moseley, Jeffrey L, Tanja Allinger, Sebastian Herzog, Patric Hoerth, Elke Wehinger, Sabeeha Merchant, and Michael Hippler. 2002. "Adaptation to Fe-Deficiency Requires Remodeling of the Photosynthetic Apparatus." *The EMBO Journal* 21 (24): 6709–20.
- Moseley, Jeffrey L, M Dudley Page, Nancy P Alder, Mats Eriksson, Jeanette Quinn, Feiris Soto, Steven M Theg, Michael Hippler, and Sabeeha Merchant. 2002. "Reciprocal Expression of Two Candidate Di-Iron Enzymes Affecting Photosystem I and Light-Harvesting Complex Accumulation." *The Plant Cell* 14 (3): 673–88.
- Mühlenhoff, Ulrich, Sabine Molik, José R. Godoy, Marta A. Uzarska, Nadine Richter, Andreas Seubert, Yan Zhang, et al. 2010. "Cytosolic Monothiol Glutaredoxins Function in Intracellular Iron Sensing and Trafficking via Their Bound Iron-Sulfur Cluster." *Cell Metabolism* 12 (4): 373–85. doi:10.1016/j.cmet.2010.08.001.
- Mühlenhoff, Ulrich, Jochen A Stadler, Nadine Richhardt, Andreas Seubert, Thomas Eickhorst, Rudolf J Schweyen, Roland Lill, and Gerlinde Wiesenberger. 2003. "A Specific Role of the Yeast Mitochondrial Carriers MRS3/4p in Mitochondrial Iron Acquisition under Iron-Limiting Conditions." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (42): 40612–20. doi:10.1074/jbc.M307847200.
- Murgia, Irene, Valentina Vazzola, Delia Tarantino, Françoise Cellier, Karl Ravet, Jean-Francois Briat, and Carlo Soave. 2007. "Knock-out of Ferritin AtFer1 Causes Earlier Onset of Age-Dependent Leaf Senescence in Arabidopsis." *Plant Physiology and Biochemistry: PPB / Société Française de Physiologie Végétale* 45 (12): 898–907. doi:10.1016/j.plaphy.2007.09.007.
- Mustroph, Angelika, M. Eugenia Zanetti, Charles J. H. Jang, Hans E. Holtan, Peter P. Repetti, David W. Galbraith, Thomas Girke, and Julia Bailey-Serres. 2009. "Profiling Translatomes of Discrete Cell Populations Resolves Altered Cellular Priorities during

- Hypoxia in Arabidopsis.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (44): 18843–48. doi:10.1073/pnas.0906131106.
- Narayanan, Narayanan N., Uzoma Ihemere, Wai Ting Chiu, Dimuth Siritunga, Sathish Rajamani, Sareena Singh, Saharu Oda, and Richard T. Sayre. 2011. “The Iron Assimilatory Protein, FEA1, from *Chlamydomonas Reinhardtii* Facilitates Iron-Specific Metal Uptake in Yeast and Plants.” *Frontiers in Plant Science* 2: 67. doi:10.3389/fpls.2011.00067.
- Negishi, Takashi, Hiromi Nakanishi, Junshi Yazaki, Naoki Kishimoto, Fumiko Fujii, Kanako Shimbo, Kimiko Yamamoto, et al. 2002. “cDNA Microarray Analysis of Gene Expression during Fe-Deficiency Stress in Barley Suggests That Polar Transport of Vesicles Is Implicated in Phytosiderophore Secretion in Fe-Deficient Barley Roots.” *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 30 (1): 83–94.
- Neilands, JB, K Konopka, B Schwyn, M Coy, T Francis, BH Paw, and A Bagg. 1987. *Comparative Biochemistry of Microbial Iron Assimilation*. Iron transport in microbes, plants and animals. Weinheim: VHC.
- Nishiguchi, Reiko, Mituru Takanami, and Atsuhiko Oka. 1987. “Characterization and Sequence Determination of the Replicator Region in the Hairy-Root-Inducing Plasmid pRiA 4b.” *MGG Molecular & General Genetics* 206 (1): 1–8. doi:10.1007/BF00326529.
- Nozoye, Tomoko, Seiji Nagasaka, Takanori Kobayashi, Michiko Takahashi, Yuki Sato, Yoko Sato, Nobuyuki Uozumi, Hiromi Nakanishi, and Naoko K Nishizawa. 2011. “Phytosiderophore Efflux Transporters Are Crucial for Iron Acquisition in Graminaceous Plants.” *The Journal of Biological Chemistry* 286 (7): 5446–54. doi:10.1074/jbc.M110.180026.
- Ogo, Yuko, Reiko Nakanishi Itai, Hiromi Nakanishi, Haruhiko Inoue, Takanori Kobayashi, Motofumi Suzuki, Michiko Takahashi, Satoshi Mori, and Naoko K. Nishizawa. 2006. “Isolation and Characterization of IRO2, a Novel Iron-Regulated bHLH Transcription Factor in Graminaceous Plants.” *Journal of Experimental Botany* 57 (11): 2867–78. doi:10.1093/jxb/erl054.
- Ogo, Yuko, Reiko N. Itai, Takanori Kobayashi, May Sann Aung, Hiromi Nakanishi, and Naoko K. Nishizawa. 2011. “OsIRO2 Is Responsible for Iron Utilization in Rice and Improves Growth and Yield in Calcareous Soil.” *Plant Molecular Biology* 75 (6): 593–605. doi:10.1007/s11103-011-9752-6.
- Ogo, Yuko, Takanori Kobayashi, Reiko Nakanishi Itai, Hiromi Nakanishi, Yusuke Kakei, Michiko Takahashi, Seiichi Toki, Satoshi Mori, and Naoko K. Nishizawa. 2008. “A Novel NAC Transcription Factor, IDEF2, That Recognizes the Iron Deficiency-Responsive Element 2 Regulates the Genes Involved in Iron Homeostasis in Plants.” *The Journal of Biological Chemistry* 283 (19): 13407–17. doi:10.1074/jbc.M708732200.
- Ojeda, Luis, Greg Keller, Ulrich Muhlenhoff, Julian C. Rutherford, Roland Lill, and Dennis R. Winge. 2006. “Role of Glutaredoxin-3 and Glutaredoxin-4 in the Iron Regulation of the Aft1 Transcriptional Activator in *Saccharomyces Cerevisiae*.” *The Journal of Biological Chemistry* 281 (26): 17661–69. doi:10.1074/jbc.M602165200.
- Perl, D. P., and P. F. Good. 1992. “Comparative Techniques for Determining Cellular Iron Distribution in Brain Tissues.” *Annals of Neurology* 32 Suppl: S76–81.
- Petit, J M, J F Briat, and S Lobréaux. 2001. “Structure and Differential Expression of the Four Members of the Arabidopsis Thaliana Ferritin Gene Family.” *The Biochemical Journal* 359 (Pt 3): 575–82.
- Petit, J. M., O. van Wuytswinkel, J. F. Briat, and S. Lobréaux. 2001. “Characterization of an Iron-Dependent Regulatory Sequence Involved in the Transcriptional Control of

- AtFer1 and ZmFer1 Plant Ferritin Genes by Iron.” *The Journal of Biological Chemistry* 276 (8): 5584–90. doi:10.1074/jbc.M005903200.
- Pfohl, Julius. 2013. „Herstellung von Fusionsproteinen Zur Lokalisation von Genen Der VTL-Familie Aus A. Thaliana “.“
- Poor, Catherine B., Seraphine V. Wegner, Haoran Li, Adrienne C. Dlouhy, Jonathan P. Schuermann, Ruslan Sanishvili, James R. Hinshaw, Pamela J. Riggs-Gelasco, Caryn E. Outten, and Chuan He. 2014. “Molecular Mechanism and Structure of the *Saccharomyces Cerevisiae* Iron Regulator Aft2.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (11): 4043–48. doi:10.1073/pnas.1318869111.
- Popescu, David. 2014. “Komplementation Der nramp3/4 Doppelmutante Durch Überexprimieren von VTL1-5 Und Untersuchung Der Eisenverteilung in Komplementierenden Keimlingen.” Bachelorarbeit.
- Portnoy, Matthew E, Laran T Jensen, and Valeria Cizewski Culotta. 2002. “The Distinct Methods by Which Manganese and Iron Regulate the Nramp Transporters in Yeast.” *The Biochemical Journal* 362 (Pt 1): 119–24.
- Portnoy, M E, X F Liu, and V C Culotta. 2000. “*Saccharomyces Cerevisiae* Expresses Three Functionally Distinct Homologues of the Nramp Family of Metal Transporters.” *Molecular and Cellular Biology* 20 (21): 7893–7902.
- Pujol-Carrion, Nuria, Gemma Belli, Enrique Herrero, Antoni Nogues, and Maria Angeles de la Torre-Ruiz. 2006. “Glutaredoxins Grx3 and Grx4 Regulate Nuclear Localisation of Aft1 and the Oxidative Stress Response in *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Journal of Cell Science* 119 (Pt 21): 4554–64. doi:10.1242/jcs.03229.
- Radisky, D, and J Kaplan. 1999. “Regulation of Transition Metal Transport across the Yeast Plasma Membrane.” *The Journal of Biological Chemistry* 274 (8): 4481–84.
- Raguzzi, F, E Lesuisse, and R R Crichton. 1988. “Iron Storage in *Saccharomyces Cerevisiae*.” *FEBS Letters* 231 (1): 253–58.
- Rampey, Rebekah A, Andrew W Woodward, Brianne N Hobbs, Megan P Tierney, Brett Lahner, David E Salt, and Bonnie Bartel. 2006. “An Arabidopsis Basic Helix-Loop-Helix Leucine Zipper Protein Modulates Metal Homeostasis and Auxin Conjugate Responsiveness.” *Genetics* 174 (4): 1841–57. doi:10.1534/genetics.106.061044.
- Ravet, Karl, Brigitte Touraine, Jossia Boucherez, Jean-François Briat, Frédéric Gaymard, and Françoise Cellier. 2009. “Ferritins Control Interaction between Iron Homeostasis and Oxidative Stress in Arabidopsis.” *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 57 (3): 400–412. doi:10.1111/j.1365-3113X.2008.03698.x.
- Robinson, N J, C M Procter, E L Connolly, and M L Guerinot. 1999. “A Ferric-Chelate Reductase for Iron Uptake from Soils.” *Nature* 397 (6721): 694–97. doi:10.1038/17800.
- Rodríguez-Celma, Jorge, Wen-Dar Lin, Guin-Mau Fu, Javier Abadía, Ana-Flor López-Millán, and Wolfgang Schmidt. 2013 a. “Mutually Exclusive Alterations in Secondary Metabolism Are Critical for the Uptake of Insoluble Iron Compounds by Arabidopsis and *Medicago Truncatula*.” *Plant Physiology* 162 (3): 1473–85. doi:10.1104/pp.113.220426.
- Rodríguez-Celma, Jorge, I Chun Pan, Wenfeng Li, Ping Lan, Thomas J. Buckhout, and Wolfgang Schmidt. 2013 b. “The Transcriptional Response of Arabidopsis Leaves to Fe Deficiency.” *Frontiers in Plant Science* 4. doi:10.3389/fpls.2013.00276.
- Rogers, E. E., D. J. Eide, and M. L. Guerinot. 2000. “Altered Selectivity in an Arabidopsis Metal Transporter.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (22): 12356–60. doi:10.1073/pnas.210214197.

- Rogers, Elizabeth E., and Mary Lou Guerinot. 2002. "FRD3, a Member of the Multidrug and Toxin Efflux Family, Controls Iron Deficiency Responses in Arabidopsis." *The Plant Cell* 14 (8): 1787–99.
- Rogers, S. O., and A. J. Bendich. 1985. "Extraction of DNA from Milligram Amounts of Fresh, Herbarium and Mummified Plant Tissues." *Plant Molecular Biology* 5 (2): 69–76. doi:10.1007/BF00020088.
- Romera, F Javier, E Alcantara, and MD de la Guardia. 1999. "Ethylene Production by Fe-Deficient Roots and Its Involvement in the Regulation of Fe-Deficiency Stress Responses by Strategy I Plants," no. 83: 51–55.
- Romera, Francisco J., María J. García, Esteban Alcántara, and Rafael Pérez-Vicente. 2011. "Latest Findings about the Interplay of Auxin, Ethylene and Nitric Oxide in the Regulation of Fe Deficiency Responses by Strategy I Plants." *Plant Signaling & Behavior* 6 (1): 167–70.
- Romheld, V., and H. Marschner. 1981. "Iron Deficiency Stress Induced Morphological and Physiological Changes in Root Tips of Sunflower." *Physiologia Plantarum* 53 (3): 354–60. doi:10.1111/j.1399-3054.1981.tb04512.x.
- Römheld, V, and H Marschner. 1986. "Evidence for a Specific Uptake System for Iron Phytosiderophores in Roots of Grasses." *Plant Physiology* 80 (1): 175–80.
- Roschztardt, Hannetz, Geneviève Conéjéro, Fanchon Divol, Carine Alcon, Jean-Luc Verdeil, Catherine Curie, and Stéphane Mari. 2013. "New Insights into Fe Localization in Plant Tissues." *Frontiers in Plant Science* 4. doi:10.3389/fpls.2013.00350.
- Rouault, Tracey A, and Wing-Hang Tong. 2005. "Iron-Sulphur Cluster Biogenesis and Mitochondrial Iron Homeostasis." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 6 (4): 345–51. doi:10.1038/nrm1620.
- Rudolph, H. K., A. Antebi, G. R. Fink, C. M. Buckley, T. E. Dorman, J. LeVitre, L. S. Davidow, J. I. Mao, and D. T. Moir. 1989. "The Yeast Secretory Pathway Is Perturbed by Mutations in PMR1, a Member of a Ca²⁺ ATPase Family." *Cell* 58 (1): 133–45.
- Rutherford, J C, S Jaron, E Ray, P O Brown, and D R Winge. 2001. "A Second Iron-Regulatory System in Yeast Independent of Aft1p." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (25): 14322–27. doi:10.1073/pnas.261381198.
- Rutherford, Julian C., Shulamit Jaron, and Dennis R. Winge. 2003. "Aft1p and Aft2p Mediate Iron-Responsive Gene Expression in Yeast through Related Promoter Elements." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (30): 27636–43. doi:10.1074/jbc.M300076200.
- Rutherford, Julian C., Luis Ojeda, Janneke Balk, Ulrich Mühlenhoff, Roland Lill, and Dennis R. Winge. 2005. "Activation of the Iron Regulon by the Yeast Aft1/Aft2 Transcription Factors Depends on Mitochondrial but Not Cytosolic Iron-Sulfur Protein Biogenesis." *The Journal of Biological Chemistry* 280 (11): 10135–40. doi:10.1074/jbc.M413731200.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. "DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (12): 5463–67.
- Santambrogio, Paolo, Giorgio Biasiotto, Francesca Sanvito, Stefano Olivieri, Paolo Arosio, and Sonia Levi. 2007. "Mitochondrial Ferritin Expression in Adult Mouse Tissues." *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 55 (11): 1129–37. doi:10.1369/jhc.7A7273.2007.
- Santi, Simonetta, and Wolfgang Schmidt. 2009. "Dissecting Iron Deficiency-Induced Proton Extrusion in Arabidopsis Roots." *The New Phytologist* 183 (4): 1072–84. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02908.x.

- Schaaf, Gabriel, Annegret Honsbein, Anderson R Meda, Silvia Kirchner, Daniel Wipf, and Nicolaus von Wirén. 2006. "AtIREG2 Encodes a Tonoplast Transport Protein Involved in Iron-Dependent Nickel Detoxification in Arabidopsis Thaliana Roots." *The Journal of Biological Chemistry* 281 (35): 25532–40. doi:10.1074/jbc.M601062200.
- Schmidt, Wolfgang. 1996. "Influence of chromium(III) on Root-Associated Fe(III) Reductase in *Platago Lanceolata* L." 47 (299): 805–10.
- Schmidt, Wolfgang. 1999. "Mechanisms and Regulation of Reduction-Based Iron Uptake in Plants." *New Phytologist* 141 (1): 1–26. doi:10.1046/j.1469-8137.1999.00331.x.
- Schmidt, Wolfgang. 2006. "Iron Stress Responses in Roots of Strategy I Plants." In *Iron Nutrition in Plants and Rhizosphere Microorganisms*, 229–50. Dordrecht, Netherland: Kluwer Academic Publishers.
- Schmidt, Wolfgang, and Thomas J. Buckhout. 2011. "A Hitchhiker's Guide to the Arabidopsis Ferrome." *Plant Physiology and Biochemistry: PPB / Société Française de Physiologie Végétale* 49 (5): 462–70. doi:10.1016/j.plaphy.2010.12.001.
- Scholz, G., R. Becker, A. Pich, and U. W. Stephan. 1992. "Nicotianamine - a Common Constituent of Strategies I and II of Iron Acquisition by Plants: A Review." *Journal of Plant Nutrition* 15 (10): 1647–65. doi:10.1080/01904169209364428.
- Séguéla, Mathilde, Jean-François Briat, Grégory Vert, and Catherine Curie. 2008. "Cytokinins Negatively Regulate the Root Iron Uptake Machinery in Arabidopsis through a Growth-Dependent Pathway." *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 55 (2): 289–300. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03502.x.
- Selote, Devarshi, Rozalynne Samira, Anna Matthiadis, Jeffrey W. Gillikin, and Terri A. Long. 2015. "Iron-Binding e3 Ligase Mediates Iron Response in Plants by Targeting Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factors." *Plant Physiology* 167 (1): 273–86. doi:10.1104/pp.114.250837.
- Semin, Boris K., Lira N. Davletshina, Alla A. Novakova, Tat'yana Y. Kiseleva, Victoriya Y. Lanchinskaya, Anatolii Y. Aleksandrov, Nora Seifulina, Il'ya I. Ivanov, Michael Seibert, and Andrei B. Rubin. 2003. "Accumulation of Ferrous Iron in *Chlamydomonas Reinhardtii*. Influence of CO₂ and Anaerobic Induction of the Reversible Hydrogenase." *Plant Physiology* 131 (4): 1756–64. doi:10.1104/pp.102.018200.
- Sinclair, Scott Aleksander, and Ute Krämer. 2012. "The Zinc Homeostasis Network of Land Plants." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1823 (9): 1553–67. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.05.016.
- Singh, Arvinder, Navjot Kaur, and Daniel J Kosman. 2007. "The Metalloreductase Fre6p in Fe-Efflux from the Yeast Vacuole." *The Journal of Biological Chemistry* 282 (39): 28619–26. doi:10.1074/jbc.M703398200.
- Singh, Arvinder, Scott Severance, Navjot Kaur, William Wiltsie, and Daniel J Kosman. 2006. "Assembly, Activation, and Trafficking of the Fet3p.Ftr1p High Affinity Iron Permease Complex in *Saccharomyces Cerevisiae*." *The Journal of Biological Chemistry* 281 (19): 13355–64. doi:10.1074/jbc.M512042200.
- Sivitz, Alicia, Claudia Grinvalds, Marie Barberon, Catherine Curie, and Grégory Vert. 2011. "Proteasome-Mediated Turnover of the Transcriptional Activator FIT Is Required for Plant Iron-Deficiency Responses." *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 66 (6): 1044–52. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04565.x.
- Stacey, Minviluz G, Ami Patel, William E McClain, Melanie Mathieu, Melissa Remley, Elizabeth E Rogers, Walter Gassmann, Dale G Blevins, and Gary Stacey. 2008. "The Arabidopsis AtOPT3 Protein Functions in Metal Homeostasis and Movement of Iron to Developing Seeds." *Plant Physiology* 146 (2): 589–601. doi:10.1104/pp.107.108183.

- Staphan, UW, I Schmidke, Staphan VW, and G Scholz. 1996. "The Nicotianamine Molecule Is Made-to-Measure for Complexation of Metal Micronutrients in Plants," no. 9: 84–90.
- Stearman, R, D S Yuan, Y Yamaguchi-Iwai, R D Klausner, and A Dancis. 1996. "A Permease-Oxidase Complex Involved in High-Affinity Iron Uptake in Yeast." *Science (New York, N.Y.)* 271 (5255): 1552–57.
- Stephan, Udo W., and Gunter Scholz. 1993. "Nicotianamine: Mediator of Transport of Iron and Heavy Metals in the Phloem?" *Physiologia Plantarum* 88 (3): 522–29. doi:10.1111/j.1399-3054.1993.tb01367.x.
- Supek, F., L. Supekova, H. Nelson, and N. Nelson. 1996. "A Yeast Manganese Transporter Related to the Macrophage Protein Involved in Conferring Resistance to Mycobacteria." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (10): 5105–10.
- Szczyпка, M S, Z Zhu, P Silar, and D J Thiele. 1997. "Saccharomyces Cerevisiae Mutants Altered in Vacuole Function Are Defective in Copper Detoxification and Iron-Responsive Gene Transcription." *Yeast (Chichester, England)* 13 (15): 1423–35. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199712)13:15<1423::AID-YEA190>3.0.CO;2-C.
- Takagi, Sei-ichi. 1976. "Naturally Occurring Iron-Chelating Compounds in Oat- and Rice-Root Washings: I. Activity Measurement and Preliminary Characterization." *Soil Science and Plant Nutrition* 22 (4): 423–33. doi:10.1080/00380768.1976.10433004.
- Takagi, Sei-ichi, Kyosuke Nomoto, and Tsunematsu Takemoto. 1984. "Physiological Aspect of Mugineic Acid, a Possible Phytosiderophore of Gramineous Plants." *Journal of Plant Nutrition* 7 (1-5): 469–77. doi:10.1080/01904168409363213.
- Teng, Yi-Shan, Yi-shin Su, Lih-Jen Chen, Yong Jik Lee, Inhwan Hwang, and Hsou-min Li. 2006. "Tic21 Is an Essential Translocon Component for Protein Translocation across the Chloroplast Inner Envelope Membrane." *The Plant Cell* 18 (9): 2247–57. doi:10.1105/tpc.106.044305.
- Terry, Norman, and Javier Abadia. 1986. "Function of Iron in Chloroplasts." *Journal of Plant Nutrition* 9 (3): 609–46. doi:10.1080/01904168609363470.
- Terzulli, A., and D. J. Kosman. 2010. "Analysis of the High-Affinity Iron Uptake System at the Chlamydomonas Reinhardtii Plasma Membrane." *Eukaryotic Cell* 9 (5): 815–26. doi:10.1128/EC.00310-09.
- Thomine, S., R. Wang, J. M. Ward, N. M. Crawford, and J. I. Schroeder. 2000. "Cadmium and Iron Transport by Members of a Plant Metal Transporter Family in Arabidopsis with Homology to Nramp Genes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (9): 4991–96.
- Tiffin, L O. 1966. "Iron Translocation I. Plant Culture, Exudate Sampling, Iron-Citrate Analysis." *Plant Physiology* 41 (3): 510–14.
- Totter, Stephen, Maryse A Block, Michael Allen, Tomas Westergren, Catherine Albrieux, Henrik V Scheller, Sabeeha Merchant, and Poul Erik Jensen. 2003. "Arabidopsis CHL27, Located in Both Envelope and Thylakoid Membranes, Is Required for the Synthesis of Protochlorophyllide." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (26): 16119–24. doi:10.1073/pnas.2136793100.
- Uauy, Cristobal, Assaf Distelfeld, Tzion Fahima, Ann Blechl, and Jorge Dubcovsky. 2006. "A NAC Gene Regulating Senescence Improves Grain Protein, Zinc, and Iron Content in Wheat." *Science (New York, N.Y.)* 314 (5803): 1298–1301. doi:10.1126/science.1133649.
- Ueta, Ryo, Naoko Fujiwara, Kazuhiro Iwai, and Yuko Yamaguchi-Iwai. 2007. "Mechanism Underlying the Iron-Dependent Nuclear Export of the Iron-Responsive Transcription Factor Aft1p in Saccharomyces Cerevisiae." *Molecular Biology of the Cell* 18 (8): 2980–90. doi:10.1091/mbc.E06-11-1054.

- Ueta, Ryo, Naoko Fujiwara, Kazuhiro Iwai, and Yuko Yamaguchi-Iwai. 2012. "Iron-Induced Dissociation of the Aft1p Transcriptional Regulator from Target Gene Promoters Is an Initial Event in Iron-Dependent Gene Suppression." *Molecular and Cellular Biology* 32 (24): 4998–5008. doi:10.1128/MCB.00726-12.
- Ueta, Ryo, Ayako Fukunaka, and Yuko Yamaguchi-Iwai. 2003. "Pse1p Mediates the Nuclear Import of the Iron-Responsive Transcription Factor Aft1p in *Saccharomyces Cerevisiae*." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (50): 50120–27. doi:10.1074/jbc.M305046200.
- Urbanowski, J L, and R C Piper. 1999. "The Iron Transporter Fth1p Forms a Complex with the Fet5 Iron Oxidase and Resides on the Vacuolar Membrane." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (53): 38061–70.
- Urzica, Eugen I., David Casero, Hiroaki Yamasaki, Scott I. Hsieh, Lital N. Adler, Steven J. Karpowicz, Crysten E. Blaby-Haas, et al. 2012. "Systems and Trans-System Level Analysis Identifies Conserved Iron Deficiency Responses in the Plant Lineage." *The Plant Cell* 24 (10): 3921–48. doi:10.1105/tpc.112.102491.
- Van Wuytswinkel, O, G Vansuyt, N Grignon, P Fourcroy, and J F Briat. 1999. "Iron Homeostasis Alteration in Transgenic Tobacco Overexpressing Ferritin." *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 17 (1): 93–97.
- Vazzola, Valentina, Alessia Losa, Carlo Soave, and Irene Murgia. 2007. "Knockout of Frataxin Gene Causes Embryo Lethality in Arabidopsis." *FEBS Letters* 581 (4): 667–72. doi:10.1016/j.febslet.2007.01.030.
- Vert, Grégory, Natasha Grotz, Fabienne Dédaldéchamp, Frédéric Gaymard, Mary Lou Guerinot, Jean-François Briat, and Catherine Curie. 2002. "IRT1, an Arabidopsis Transporter Essential for Iron Uptake from the Soil and for Plant Growth." *The Plant Cell* 14 (6): 1223–33.
- von Wiren N, Klair, Bansal, Briat, Khodr, Shioiri, Leigh, and Hider. 1999. "Nicotianamine Chelates Both FeIII and FeII. Implications for Metal Transport in Plants." *Plant Physiology* 119 (3): 1107–14.
- Vose, P.B. 1982. "Iron Nutrition in Plants: A World Overview," no. 5: 233–49.
- Walker, Elsbeth L, and Erin L Connolly. 2008. "Time to Pump Iron: Iron-Deficiency-Signaling Mechanisms of Higher Plants." *Current Opinion in Plant Biology* 11 (5): 530–35. doi:10.1016/j.pbi.2008.06.013.
- Wang, Ning, Yan Cui, Yi Liu, Huajie Fan, Juan Du, Zongan Huang, Youxi Yuan, Huilan Wu, and Hong-Qing Ling. 2013. "Requirement and Functional Redundancy of Ib Subgroup bHLH Proteins for Iron Deficiency Responses and Uptake in Arabidopsis Thaliana." *Molecular Plant* 6 (2): 503–13. doi:10.1093/mp/sss089.
- Waters, Brian M, Dale G Blevins, and David J Eide. 2002. "Characterization of FRO1, a Pea Ferric-Chelate Reductase Involved in Root Iron Acquisition." *Plant Physiology* 129 (1): 85–94. doi:10.1104/pp.010829.
- Waters, Brian M, Heng-Hsuan Chu, Raymond J Didonato, Louis A Roberts, Robynn B Eisley, Brett Lahner, David E Salt, and Elsbeth L Walker. 2006. "Mutations in Arabidopsis Yellow Stripe-like1 and Yellow Stripe-like3 Reveal Their Roles in Metal Ion Homeostasis and Loading of Metal Ions in Seeds." *Plant Physiology* 141 (4): 1446–58. doi:10.1104/pp.106.082586.
- West, A. H., D. J. Clark, J. Martin, W. Neupert, F. U. Hartl, and A. L. Horwich. 1992. "Two Related Genes Encoding Extremely Hydrophobic Proteins Suppress a Lethal Mutation in the Yeast Mitochondrial Processing Enhancing Protein." *The Journal of Biological Chemistry* 267 (34): 24625–33.
- Wollman, Minai, and Nechushtai. 1999. "The Biogenesis and Assembly of Photosynthetic Proteins in Thylakoid membranes1." *Biochimica et Biophysica Acta* 1411 (1): 21–85.

- Wu, Ting, Heng-Tao Zhang, Yi Wang, Wen-Suo Jia, Xue-Feng Xu, Xin-Zhong Zhang, and Zhen Hai Han. 2012. "Induction of Root Fe(III) Reductase Activity and Proton Extrusion by Iron Deficiency Is Mediated by Auxin-Based Systemic Signalling in *Malus Xiaojinensis*." *Journal of Experimental Botany* 63 (2): 859–70. doi:10.1093/jxb/err314.
- Yamaguchi-Iwai, Y., A. Dancis, and R. D. Klausner. 1995. "AFT1: A Mediator of Iron Regulated Transcriptional Control in *Saccharomyces Cerevisiae*." *The EMBO Journal* 14 (6): 1231–39.
- Yamaguchi-Iwai, Y, R Stearman, A Dancis, and R D Klausner. 1996. "Iron-Regulated DNA Binding by the AFT1 Protein Controls the Iron Regulon in Yeast." *The EMBO Journal* 15 (13): 3377–84.
- Yang, Jian Li, Wei Wei Chen, Li Qian Chen, Cheng Qin, Chong Wei Jin, Yuan Zhi Shi, and Shao Jian Zheng. 2013. "The 14-3-3 Protein GENERAL REGULATORY FACTOR11 (GRF11) Acts Downstream of Nitric Oxide to Regulate Iron Acquisition in *Arabidopsis Thaliana*." *The New Phytologist* 197 (3): 815–24. doi:10.1111/nph.12057.
- Yang, Thomas J W, Wen-Dar Lin, and Wolfgang Schmidt. 2010. "Transcriptional Profiling of the *Arabidopsis* Iron Deficiency Response Reveals Conserved Transition Metal Homeostasis Networks." *Plant Physiology* 152 (4): 2130–41. doi:10.1104/pp.109.152728.
- Yoshida, Kumi, and Takashi Negishi. 2013. "The Identification of a Vacuolar Iron Transporter Involved in the Blue Coloration of Cornflower Petals." *Phytochemistry* 94 (October): 60–67. doi:10.1016/j.phytochem.2013.04.017.
- Yuan, Youxi, Huilan Wu, Ning Wang, Jie Li, Weina Zhao, Juan Du, Daowen Wang, and Hong-Qing Ling. 2008. "FIT Interacts with AtbHLH38 and AtbHLH39 in Regulating Iron Uptake Gene Expression for Iron Homeostasis in *Arabidopsis*." *Cell Research* 18 (3): 385–97. doi:10.1038/cr.2008.26.
- Zancani, Marco, Carlo Peresson, Antonino Biroccio, Giorgio Federici, Andrea Urbani, Irene Murgia, Carlo Soave, Fulvio Micali, Angelo Vianello, and Francesco Macri. 2004. "Evidence for the Presence of Ferritin in Plant Mitochondria." *European Journal of Biochemistry / FEBS* 271 (18): 3657–64. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04300.x.
- Zhai, Zhiyang, Sheena R. Gayomba, Ha-Il Jung, Nanditha K. Vimalakumari, Miguel Piñeros, Eric Craft, Michael A. Rutzke, et al. 2014. "OPT3 Is a Phloem-Specific Iron Transporter That Is Essential for Systemic Iron Signaling and Redistribution of Iron and Cadmium in *Arabidopsis*." *The Plant Cell* 26 (5): 2249–64. doi:10.1105/tpc.114.123737.
- Zhang, Yu, Yong-Han Xu, Hong-Yin Yi, and Ji-Ming Gong. 2012. "Vacuolar Membrane Transporters OsVIT1 and OsVIT2 Modulate Iron Translocation between Flag Leaves and Seeds in Rice." *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 72 (3): 400–410. doi:10.1111/j.1365-313X.2012.05088.x.
- Zheng, Luqing, Yinghui Ying, Lu Wang, Fang Wang, James Whelan, and Huixia Shou. 2010. "Identification of a Novel Iron Regulated Basic Helix-Loop-Helix Protein Involved in Fe Homeostasis in *Oryza Sativa*." *BMC Plant Biology* 10: 166. doi:10.1186/1471-2229-10-166.
- Zimmermann, Philip, Matthias Hirsch-Hoffmann, Lars Hennig, and Wilhelm Gruissem. 2004. "GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* Microarray Database and Analysis Toolbox." *Plant Physiology* 136 (1): 2621–32. doi:10.1104/pp.104.046367.

5.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht der Fe-Aufnahmestrategien in Pflanzen	4
Abbildung 2: Zusammenfassung der Eisentransporter und Speicherung innerhalb einer Pflanzenzelle.	9
Abbildung 3: Zusammenfassung der Eisen-Aufnahme-Mechanismen in Hefezellen.	13
Abbildung 4: Überblick über den intrazellulären Eisentransport und Speicherung in Hefezellen.	16
Abbildung 5: Stammbaum-Analyse der VTL-Proteine aus <i>Arabidopsis thaliana</i> , basierend auf der Aminosäuresequenz kodiert von VTL5	38
Abbildung 6: Phylogenetischer Stammbaum der VTL-Proteine	39
Abbildung 7: Aminosäuresequenzvergleich von <i>Arabidopsis</i> VTL5 und den beiden CCC1-like Proteinen aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	39
Abbildung 8: Semiquantitative PCR Analyse der eisenabhängigen Expression der <i>VTL</i> Gene.	40
Abbildung 9: Sequenzvergleich und hypothetische Proteinstruktur der VTL-Proteine.....	41
Abbildung 10: Vergleich der gewebespezifischen Expression von <i>VTL1</i> und <i>VTL5</i>	43
Abbildung 11: Analyse der eisenspezifischen Expression von <i>VTL1</i> und 5 in transgenen Keimlingen..	44
Abbildung 12: Analyse der ernährungsspezifischen Expression von <i>VTL1</i> und 5 in transgenen Keimlingen..	45
Abbildung 13: Fluorometrischer GUS- <i>Assay</i> zur Analyse der ernährungsspezifischen Aktivität des VTL1 und 5 Promotors.....	46
Abbildung 14: qRT-PCR Analyse der ernährungsspezifischen Expression von <i>VTL1</i> , 2 und 5.	47
Abbildung 15: Komplementation der $\Delta ccc1$ Hefemutante.	48
Abbildung 16: Komplementation der $\Delta zrc1$ Hefemutante.....	49
Abbildung 17: Komplementation der $\Delta pmr1(a)$ und $\Delta smf1$ (b)) Hefemutante.	50
Abbildung 18: Bestimmung der Eisenkonzentration von Vakuolen aus $\Delta ccc1$ Zellen, transformiert mit <i>VTL1-5</i>	51
Abbildung 19: Lokalisationsbilder von Protoplasten aus mit mCherry-VTL1 transformierten Pflanzen	53
Abbildung 20: Lokalisationsbilder von Protoplasten aus mit mCherry-VTL1 und PTR2-YFP transformierten Tabakblättern.	54
Abbildung 21: Lokalisationsbilder von mit mCherry-VTL4 und PTR1-YFP (Plasmamembranmarker) transformierten Tabakblättern	55
Abbildung 22: Lokalisationsbilder von mit mCherry-VTL4 und PTR2-YFP (Tonoplastmarker) transformierten Tabakblättern	55
Abbildung 23: Eisenmessung von $\Delta ccc1$ Zellen transformiert mit dem Leervektor pUE1, VTL1-pUE1 oder VTL4-pUE1.....	56

Abbildung 24: Eisenmessung von $\Delta ccc1$ Zellen transformiert mit dem Leervektor pUE1, VTL1-pUE oder VTL3-pUE1.....	57
Abbildung 25: Überprüfung der Überexpression der <i>VTL</i> Gene in der <i>nramp3/4</i> (a) und <i>vit1</i> (b) Mutante von <i>Arabidopsis</i> , mittels semiquantitativer PCR Analyse.....	58
Abbildung 26: Vergleich vom Wachstum der Keimlinge der <i>vit1-1</i> Mutante alleine und transformiert mit je einem <i>VTL</i> Gen oder dem Leervektor GL1..	59
Abbildung 27: Komplementation der <i>vit1-1</i> Mutante durch Überexpression von <i>VTL</i> Genen.....	59
Abbildung 28: Eisenfärbung mittels <i>Perls Staining</i> in transgenen <i>vit1-1</i> Embryonen.	60
Abbildung 29: Vergleich vom Wachstum der Keimlinge der <i>nramp3/4</i> Doppelmutante alleine und transformiert mit je	62
Abbildung 30: Komplementation der <i>nramp3/nramp4</i> Doppelmutante durch Überexpression von <i>VTL</i> Genen.....	62
Abbildung 31: Eisenkonzentration in <i>Arabidopsis</i> Samen.	63
Abbildung 32: Semiquantitative PCR Analyse der <i>VTL</i> Gene in Abhängigkeit von der Eisernährung in der <i>vit3</i> (a) oder <i>vit5</i> (b) <i>knockout</i> Mutante.	64
Abbildung 33: Semiquantitative PCR Analyse der Kurzzeitantwort der <i>VTL</i> Gene auf Eisen in Wildtyp, <i>vit3</i> und <i>vit5</i> Pflanzenwurzeln.	65
Abbildung 34: Semiquantitative PCR Analyse von fünf Tage alten WT, <i>vit3</i> und <i>vit5</i> Keimlingen...	65
Abbildung 35: Messung der Eisenkonzentration in Spross und Wurzel der <i>vit3</i> und <i>vit5 knockout</i> Mutante in Abhängigkeit von der Eisernährung.	66
Abbildung 36: Vergleich der Samenanlagen in Schoten von Wildtyp Pflanzen, Wildtyppflanzen transformiert mit VTL1-mCherry (Kontrollkonstrukt) oder VTL1-RNAi.	67
Abbildung 37: Entwicklungsstadium abhängige Expression von <i>VIT1</i>	74
Abbildung 38: Genevestigator Daten. Gewebespezifische Expression der <i>VTL</i> Gene.....	75
Abbildung 39: Entwicklungsstadium abhängige Expression von <i>VTL5</i>	80
Abbildung 40: Modell über die Wirkungsweise der VTL Transporter.....	82

5.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bezeichnungen und Hersteller der verwendeten Geräte.....	19
Tabelle 2: Verwendete Vektoren.....	20
Tabelle 3: Verwendete Primer, deren Sequenzen (5'→3'), Länge und Verwendung.	20
Tabelle 4: Verwendetes Lebendmaterial mit Selektionsfaktor und entsprechendem Nährmedium.	21
Tabelle 5: Zusammensetzung der Medien.....	22
Tabelle 6: Verwendete Reaktionskits, Enzyme, Antikörper und Fertiglösungen.....	24
Tabelle 7: sonstige Materialien.....	24

6. Anhang

VTL1 (At1g21140)

ATGGAATCACACAACGTGAGCAACAGCTTGAACCTAGACATGGAGATGGATCAAGAAAAGGCTTTCGACTACTCC
M E S H N V S N S L N L D M E M D Q E K A F D Y S
AAAAGAGCTCAATGGCTAAGAGCCGCCGTGCTTGGTGCCAACGACGGTCTTGTCTCGACGGCTTCACCTATGATG
K R A Q W L R A A V L G A N D G L V S T A S L M M
GGTGTCCGTGCGGTAAAGCAAGACGTCAAAGTCATGATCTTATCTGGTTTCGCCGGTTTGGTCGCCGGAGCTTGT
G V G A V K Q D V K V M I L S G F A G L V A G A C
AGCATGGCTATCGGAGAGTTTGTCTCCGTTTACTCTCAGTACGACATCGAGGTGGCTCAAATGAAGAGAGAGAAC
S M A I G E F V S V Y S Q Y D I E V A Q M K R E N
GGAGGACAAGTGGAGAAAGAGAAGCTTCCGAGTCCCATGCAAGCGGCTGCCGCGTCTGCGTTAGCGTTTTCTTTG
G G Q V E K E K L P S P M Q A A A A S A L A F S L
GGTGCGATTGTGCCTTTAATGGCGGCTGCGTTTGTGAAAGACTATCACGTGAGAATAGGAGCGATCGTGGCGGCG
G A I V P L M A A A F V K D Y H V R I G A I V A A
GTGACATTGGCGTTAGTGATGTTTGGGTGGTTAGGAGCGGTTTGGGGAAGCACCAGGTGTTTAAGTCGTCGGCT
V T L A L V M F G W L G A V L G K A P V F K S S A
AGGGTTTTGATTGGAGGATGGTTAGCTATGGCCGTTACTTTTGGTTTGACAAAACCTGATTGGGACACATAGTCTG
R V L I G G W L A M A V T F G L T K L I G T H S L
TGA
*

Abbildung A1: Nukleotidsequenz der kodierenden Region von VTL1 und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz im Einbuchstabencode. Das Stoppcodon ist durch ein Sternchen markiert.

VTL2 (At1g76800)

ATGGATCAATCAGGTAGTAACACGAACATGGACATAGAGAAGGAATCAACTACATTTGATTACTCCAAACGTTCC
M D Q S G S N T N M D I E K E S T T F D Y S K R S
CAATGGCTACGTGCGGCCGTGCTCGGAGCCAACGATGGTCTAGTCTCCACCGCGTCGTTGATGATGGGAGTTGGA
Q W L R A A V L G A N D G L V S T A S L M M G V G
GCTGTGAAGCATGACGTCAAGGCAATGATTCTCTCCGATTTCGACGGGATGGTGGCAGGAGCTTGTAGTATGGCC
A V K H D V K A M I L S G F A G M V A G A C S M A
ATAGGAGAGTTTCGTCTCAGTTTACTCTCAGTACGATATAGAGGTGGCTCAGATGGAGAGAGACAGTGTGGAGATA
I G E F V S V Y S Q Y D I E V A Q M E R D S V E I
GAGAAAGAGAAGCTTCCTAGTCCGATGCAAGCCGCGGCTGCGTCTGCCCTTTCGCGAGGTGCGATTGTA
E K E K L P S P M Q A A A A S A L A F S A G A I V
CCGCTTTTGGCTGCTGCTTTTGTGAAAGAGTATAAGATGAGGATCATTTTCGGTTGTGGTGGCGGTTACGGTAGCT
P L L A A A F V K E Y K M R I I S V V V A V T V A
CTTATGGTTTTTCGGATGGTTAGGAGCAGCGCTAGGGAAGGCACCAGCGTTAGGTCATCGGCTAGGGTTTTGTTT
L M V F G W L G A A L G K A P A V R S S A R V L F
GGAGGTTGGTTAGCTATGGCGGTTACGTTTGGCTTGACTAAGCTTATTGGGTTATATGGATTGTGA
G G W L A M A V T F G L T K L I G L Y G L *

Abbildung A2: Nukleotidsequenz der kodierenden Region von VTL2 und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz im Einbuchstabencode. Das Stoppcodon ist durch ein Sternchen markiert.

VTL3 (At3g43630)

ATGGAATCTCACAACACCTTGAACCTAGACATGGAGAAAAGATCAAGAAAAGGCTTTTGACTACTCCAAACGAGCT
 M E S H N T L N L D M E K D Q E K A F D Y S K R A
 CAATGGCTAAGAGCCGCTGTGCTTGGTGCCAACGACGGTCTTGTCTCGACGGCTTCACTTATGATGGGTGTTGGT
 Q W L R A A V L G A N D G L V S T A S L M M G V G
 GCGGTCAAGCAAAACGTCAAGATCATGATCTTAAGTGGTTTTGCCGGTTTAGTGCCCGGAGCTTGTAGCATGGCG
 A V K Q N V K I M I L T G F A G L V A G A C S M A
 ATTGGAGAGTTTGTCTCTGTTTACTCTCAATATGACATAGAGGTAGCTCAGATGAAGAGAGAGACCGGAGGAGAG
 I G E F V S V Y S Q Y D I E V A Q M K R E T G G E
 ATTGAGAAAAGAGAAGCTTCCAAGTCCAACACAAGCGGCTGCAGCATCTGCGTTAGCGTTTTCTCTTGGGGCGATG
 I E K E K L P S P T Q A A A A S A L A F S L G A M
 GTGCCGTTATTGGCGGCAGCGTTTGTGAAAGAGTATAAAGTGAGGATTGGTGAATAGTGGCAGCGGTTACGTTG
 V P L L A A A F V K E Y K V R I G A I V A A V T L
 GCGTTGGTGATGTTTGGATGGTTAGGGGCGGTTTTGGGGAAAGCACCAGTGGTTAAGTCGTCGCTTAGGGTTTTG
 A L V M F G W L G A V L G K A P V V K S S L R V L
 GTTGGAGGATGGTTAGCTATGGCCATTACGTATGGTTTTACAAAACCTCATTGGGTACATAGTCATATGTATGTG
 V G G W L A M A I T Y G F T K L I G S H S H M Y V
 TGA
 *

Abbildung A3: Nukleotidsequenz der kodierenden Region von VTL3 und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz im Einbuchstabencode. Das Stoppcodon ist durch ein Sternchen markiert.

VTL4 (At3g43660)

ATGGAATCAAACAACAACAACCTTGAACCTAGACATGGAGAAAGATCAAGAAACGACTTTTCGACTACTCCAAACGA
 M E S N N N N L N L D M E K D Q E T T F D Y S K R
 GCTCAATGGCTACGAGCCGCCGTGCTAGGTGCCAACGATGGTCTTGTCTCAACGGCTTCACTTATGATGGGTATT
 A Q W L R A A V L G A N D G L V S T A S L M M G I
 GGTGCCGTGAAGCAAGACGTCAGAATCATGCTCTTAACCGTTTTGCCGGTTTAGTGCCCGGAGCTTGTAGCATG
 G A V K Q D V R I M L L T G F A G L V A G A C S M
 GCGATCGGAGAGTTTATCTCCGTTTACTCTCAGTACGACATAGAGGTGGCTCAGATGAAGAGAGAGAGCGGAGGG
 A I G E F I S V Y S Q Y D I E V A Q M K R E S G G
 GAGACAAAGAAAAGAGAAGCTTCCAAGTCCAACGCAAGCGGCTATCGCGTCTGCATTAGCATTTACTCTAGGAGCG
 E T K K E K L P S P T Q A A I A S A L A F T L G A
 ATTGTGCCGCTATTGGCGGCTGCGTTTGTGAAAAGAGTATAAAGTTAGGATTGGAGTGATTGTGGCGGCGGTTACA
 I V P L L A A A F V K E Y K V R I G V I V A A V T
 TTGGCGTTAGTGATGTTTGGATGGTTAGGGGCGGTTTTGGGAAAAGCACCAGTGGTTAAGTCGTTGGTTCTGGGTT
 L A L V M F G W L G A V L G K A P V V K S L V R V
 TTGATTGGAGGATGGTTAGCTATGGCCATTACGTTTGGTTTTACAAAACCTCGTTGGGTACATGGTCTTTGA
 L I G G W L A M A I T F G F T K L V G S H G L *

Abbildung A4: Nukleotidsequenz der kodierenden Region von VTL4 und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz im Einbuchstabencode. Das Stoppcodon ist durch ein Sternchen markiert.

VTL5 (At3g25190)

ATGACTTCCAACGTTTCAGCTTTTCAGAAACAAACAGCCCAAGGAATCAGAAAACCCGTCCGAGAGCAGAGAAGGAG
 M T S N V Q L S E T N S P R N Q K T R P R A E K E
 GAAGTGGACTACATGCAGAGAGCTCAGTGGCTAAGAGCTGCCTTGCTTGGAGCCAACGATGGTCTGGTCACAGTC
 E V D Y M Q R A Q W L R A A L L G A N D G L V T V
 GCTTCGCTAATGATGGGTGTTGGTTCTATCAAAGAAGACGTCAAAGCAATGCTTCTCGTTGGTTTTGCTGGCCTT
 A S L M M G V G S I K E D V K A M L L V G F A G L
 GTTGGCGGTGCTTGTAGTATGGCTATTGGAGAGTTTGTGTCTGTGTGCACCCAAAGGGATATTGAAACTGCACAG
 V A G A C S M A I G E F V S V C T Q R D I E T A Q
 ATGAAGAGAGCTATTGAACATAAGACATCACTATCAGCAATCGACGAACAAGAGGAGGAGGAGAAGAAAAGAAAGG
 M K R A I E H K T S L S A I D E Q E E E E K K E R
 CTGCCAAATCCAGGGCAAGCAGCAATTGCATCGGCGTTAGCGTTTTTCAGTGGGTGCAGCAATGCCGCTTCTGGGC
 L P N P G Q A A I A S A L A F S V G A A M P L L G
 GCTGTATTCATAGAGAATCATAAGGTAAGAATGGTGGTGGTAGCGTTGTGGCCACCATAGCATTGGTTGTGTTT
 A V F I E N H K V R M V V V A V V A T I A L V V F
 GGAGTACTGTCGGTCTTGGGAAAGACAAGTGTGGTTAAGTCGAGCGTCAGGGTGGTGATTGGTGGTTGGATG
 G V T G G A V L G K T S V V K S S V R V V I G G W M
 GCTATGGCTCTTACCTTTGGTCTCACCAAGTTCATTGGCTCTGCAGCCATGCAAATCTAG
 A M A L T F G L T K F I G S A A M Q I *

Abbildung A5: Nukleotidsequenz der kodierenden Region von VTL5 und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz im Einbuchstabencode. Das Stoppcodon ist durch ein Sternchen markiert.

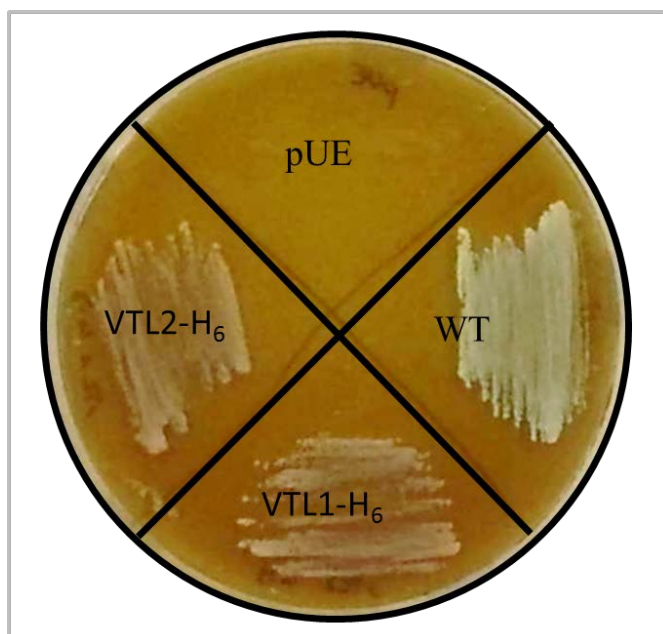


Abbildung A6: Komplementation der *Δccc1* Hefemutante mit His-tag markierten *VTL1* und *VTL2* Genen. Der Wildtyp und die mit dem Leervektor pUE1 oder eines der *VTL* Gene transformierten Hefezellen wurden auf YPD Medium mit 7 mM FeSO₄ ausgebracht und für drei Tage bei 28 °C inkubiert.

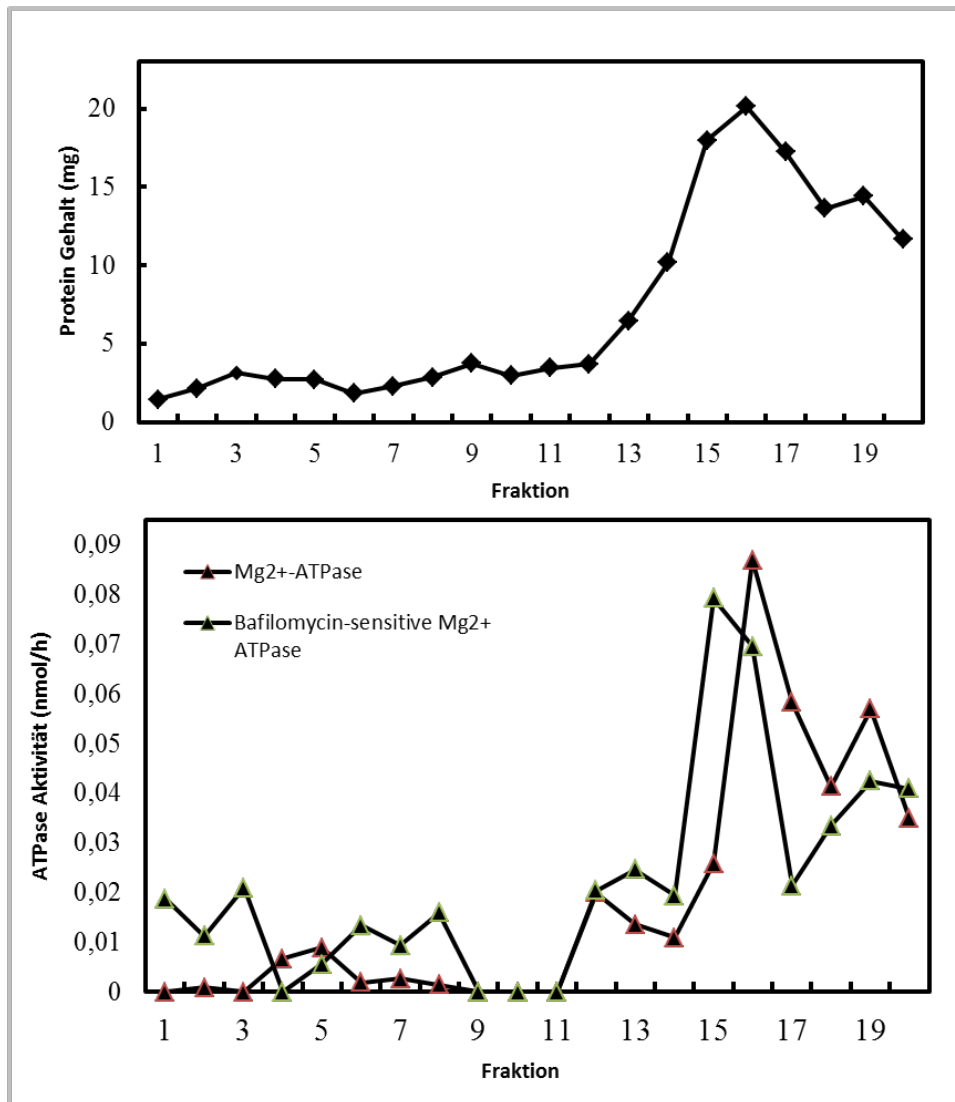


Abbildung A7: Saccharose-Dichte-Gradient zur Isolierung der Membranen aus der Hefe-Vakuolen Fraktion. Die Vakuolenfraktion wurde abgenommen und auf einen kontinuierlichen Saccharosegradienten (10 bis 60 %) aufgetragen und zentrifugiert (14 h, 25 000 rpm, Beckmann Rotor SW28, 4 °C). Der Gradient wurde in ein ml Fraktionen fraktioniert und die Aktivität der Markerenzyme für die Vakuole (bafilomycin- abhängige ATPase), die Plasmamembran (vanadat-abhängige ATPase) und das Endoplasmatische Retikulum (Cytochrom c Reduktase) nach Luster & Buckhout, 1989 gemessen (Luster & Buckhout, 1989). Die Aktivität der vanadat-abhängigen ATPase und der Cytochrom c Reduktase lag unterhalb der Nachweisgrenze.

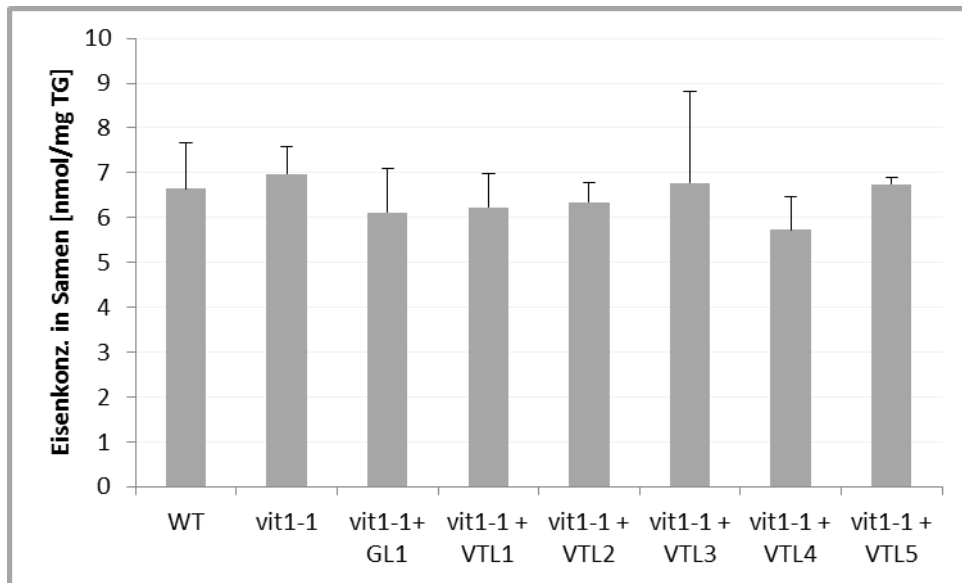


Abbildung A8: Eisenkonzentration in *Arabidopsis* Samen. Die Eisenkonzentration wurde in Wildtyp, *vit1-1* Mutanten- und Mutantensamen transformiert mit dem Leervektor (GL1) oder einem der *VTL* Genen, gemessen. Es konnte kein signifikanter Unterschied detektiert werden.

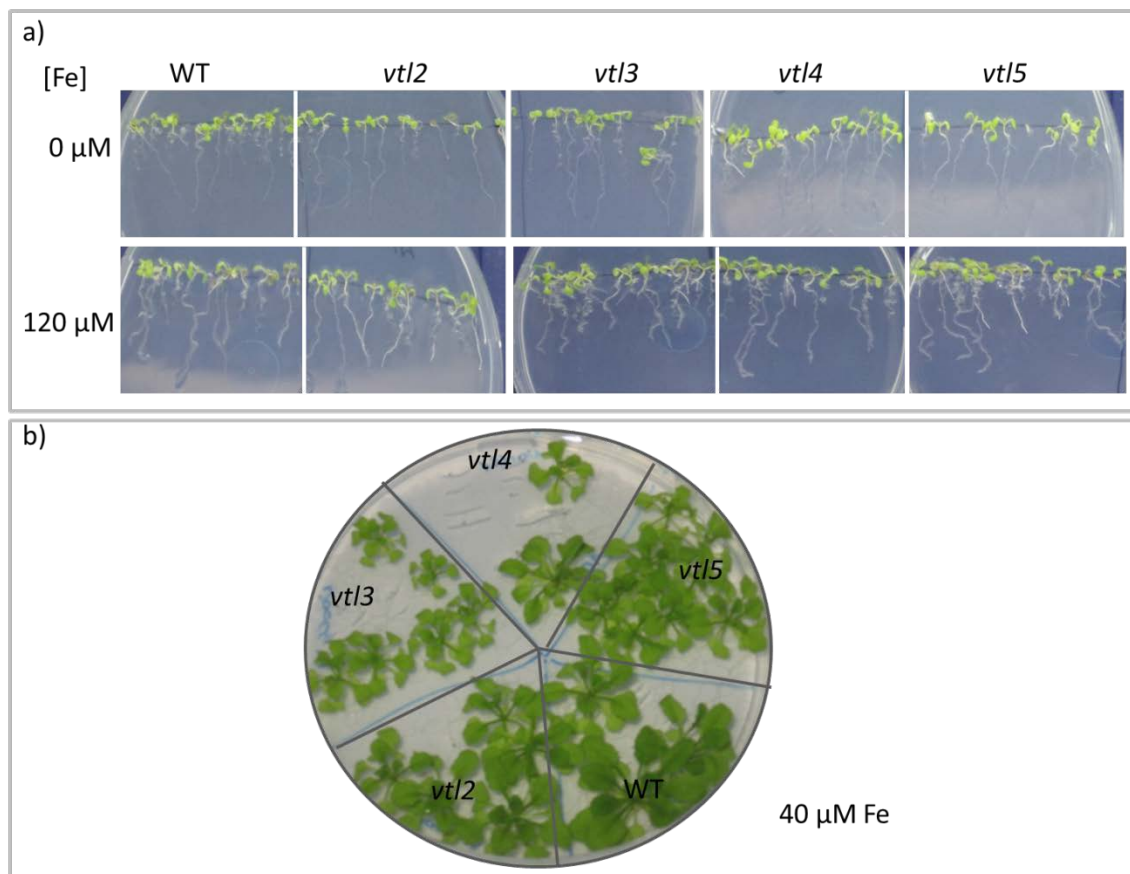


Abbildung A9: Untersuchung des Phänotyps der *vtl* T-DNA Mutanten. a) Vergleich von sechs Tage alten Keimlingen angezogen auf ES Medium mit 0 oder 120 μM Eisen. b) Vergleich von zwei Wochen alten Pflanzen, angezogen auf ES Medium mit 40 μM Eisen.

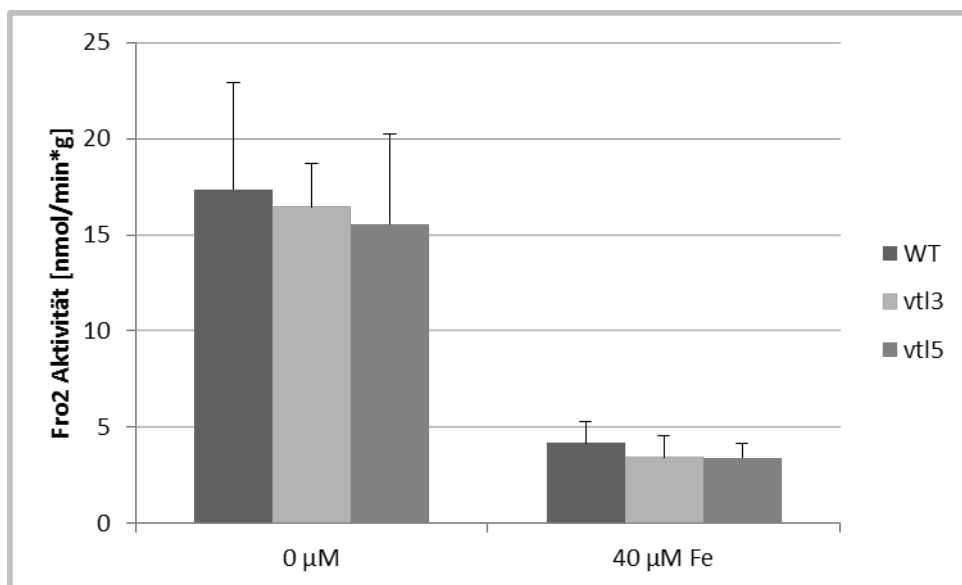


Abbildung A10: Messung der Fe^{3+} Chelatreduktase (FRO2) in Wildtyp und *VTL* T-DNA Mutanten (*vtl3* und *vtl5*) in Abhängigkeit von der Eisernährung. Vier Wochen alte *Arabidopsis* Pflanzen wurden für 48 Stunden in Hydrokultur mit verschiedener Eisenkonzentration kultiviert.

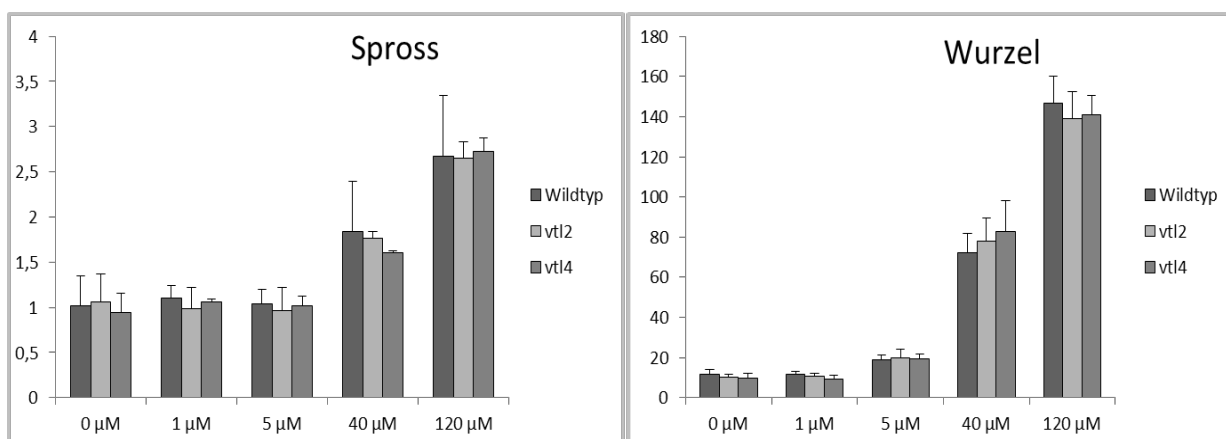


Abbildung A11: Messung der Eisenkonzentration in Spross und Wurzel der heterozygoten *vtl2* und *vtl4* T-DNA Mutante in Abhängigkeit von der Eisernährung. Vier Wochen alte *Arabidopsis* Pflanzen wurden für 10 Tage in Hydrokultur mit verschiedener Eisenkonzentration kultiviert und anschließend Spross und Wurzel geerntet und die Eisenkonzentration gemessen.

Danksagung

Zu allererst möchte ich Herrn Prof. Thomas Buckhout für die Möglichkeit danken, meine Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen und dafür, dass er mich trotz mehrfachem Familienzuwachs stets unterstützt und weitergebracht hat und durch sein Vertrauen in mich mein eigenes gestärkt hat.

Mein besonderer Dank geht an die beiden Labor-Engel Susanne Olstowski-Jacoby und Marion Dewender, die mich wirklich in jeder Situation unterstützt haben, für jede Gefühlsregung das passende Wort, Gebäck oder Getränk parat hatten und sich nie zu schade waren mich bei stupiden Massenversuchen zu unterstützen oder mit mir auf Problem-Lösungssuche zu gehen. Natürlich danke ich auch allen weiteren ehemaligen und amtierenden Mitgliedern der Arbeitsgruppe, erwähnt seien Franziska Drews, Weiqiong Li, Christin Schläwicke, Julius Pfohl und Paul Thimm, die mich mit Herz und Tat begleitet haben und stets für eine schöne Arbeitsatmosphäre gesorgt haben. Ebenso wie HyeJung Lee, die mich mit ihrer koreanischen Sicht auf deutsche Unterhaltungsmedien, Politik und Menschen regelmäßig zum Lachen gebracht hat und dafür gesorgt hat, dass ich auch an einem Leben außerhalb des Labors teilnehme.

Dr. Kurt Zoglauer und seinen Mitarbeitern, insbesondere Andrea Rupps und Juliane Raschke, danke ich für die gute Zusammenarbeit, dem regen Austausch von Gedanken und dringend benötigten Materialien und dem akribischen Korrekturlesen, was diese Arbeit um einiges besser gemacht hat.

Herrn Prof. Bernhard Grimm danke ich für die Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten und ihm und seinem Team für die Nutzung der Klimakammer und des Gewächshauses, insbesondere Angelika Pötter für die Betreuung meiner Pflanzen.

Herrn Prof. von Wirén danke ich für die Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten.

Dr. Wolfgang Schmidt und seinem „Tiger-Lab“ danke ich für die Möglichkeit eines Forschungsaufenthalts in seinen Gefilden.

Und natürlich danke ich Janine Maimanakos (geteiltes Leid ist halbes Leid), Katrin Bossmann (für die Aufmunterung und Babybetreuung), Julius Pfohl (für die stets bereitwillige Beseitigung meiner Formatierungsünden) und Stefanie Spingat die mir in der mühseligen Phase des Schreibens und gleichzeitigen Babybetreuung mit jeglicher Art von Motivation und Chaosbeseitigung geholfen haben.

Zum Schluss danke ich meinen Eltern und meinem Opa, Johannes Bossmann, die durch ihren unbeirrbaren Glauben an mich, dafür gesorgt haben, dass ich am Ball blieb und meinem Mann, Matthieu Gollhofer, für Liebe, Glück und privates Know How.

Publikationen

Gollhofer, Julia, Christin Schläwicke, Nadine Jungnick, Wolfgang Schmidt, and Thomas J. Buckhout. 2011. "Members of a Small Family of Nodulin-like Genes Are Regulated under Iron Deficiency in Roots of *Arabidopsis Thaliana*." *Plant Physiology and Biochemistry* 49 (5): 557–64. doi:10.1016/j.plaphy.2011.02.011.

Gollhofer, Julia, Roman Timofeev, Ping Lan, Wolfgang Schmidt, and Thomas J. Buckhout. 2014. "Vacuolar-Iron-transporter1-like Proteins Mediate Iron Homeostasis in *Arabidopsis*." *PloS One* 9 (10): e110468. doi:10.1371/journal.pone.0110468.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe.

Alle Angaben, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Berlin, den